

Aus dem Fachbereich Biophysik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

REGULATION VON KALZIUMSIGNALEN IM IMMUNSYSTEM
- Regulation of calcium signals in the immune system -

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2015

vorgelegt von

KATHRIN DÖRR

geb. am 12.11.1984 in Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Kalzium-Signale	11
1.1.1	Kalzium	11
1.1.2	CRAC	12
1.1.3	Orai	14
1.1.4	STIM	17
1.1.5	Ca ²⁺ -Signale und das Immunsystem	19
1.1.6	Ca ²⁺ -Signale und Krebs	20
1.1.7	Ca ²⁺ -Signale und Glykosylierung	20
1.2	Glykosylierung	21
1.2.1	Begriff der Glykosylierung	21
1.2.2	Mechanismen der Glykosylierung	22
1.2.3	Glyko-bindende Proteine	25
1.2.4	Glykosyltransferasen	34
1.2.5	Bedeutungen der Glykosylierung	36
1.3	Regulation der Genexpression durch miRNAs	39
1.3.1	miRNAs im Immunsystem	40
2	Materialien	43
2.1	Antikörper	43
2.1.1	Primäre Antikörper	43
2.1.2	Sekundäre Antikörper	43
2.2	Bakterienstämme	44
2.3	Chemikalien	44
2.4	Größenstandards	45
2.5	Laborgeräte	46
2.5.1	Messplatz-Komponenten	46
2.5.2	Sonstige verwendete Laborgeräte	47
2.6	Lösungen	48
2.6.1	Patch-Lösungen	48
2.6.2	Imaging-Lösungen	48
2.6.3	Sonstige verwendete Lösungen	49
2.7	Lektine	51
2.8	Modifizierende Enzyme	52
2.9	Oligonukleotide	52
2.9.1	miRNA-mimics	52
2.9.2	qRT-PCR-Primer	52
2.9.3	PCR-Primer	53

2.9.4	siRNA	54
2.10	Reagenzien-Systeme	54
2.11	Verwendete Vektoren und klonierte Konstrukte	55
2.11.1	Verwendete Plasmide	55
2.11.2	Hergestellte und verwendete Konstrukte	57
2.12	Verbrauchsmaterial	58
2.13	Zellkultur	58
2.13.1	Transfektionsreagenzien	58
2.13.2	Zellkulturmedien	59
2.13.3	Zellkulturzusätze	59
2.13.4	Zelllinien	60
3	Methoden	61
3.1	Rekombinante DNA-Technologien	61
3.1.1	Polymerase-Ketten-Reaktion	61
3.1.2	Overlap-Extension-PCR	63
3.1.3	Kolonien-PCR	63
3.1.4	Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen	64
3.1.5	Dephosphorylierung von DNA mit Phosphatase	65
3.1.6	DNA-Analyse und gelelektrophoretische Auftrennung	65
3.1.7	Ligation	67
3.1.8	Expression und Isolation heterologer DNA-Konstrukte	67
3.2	Arbeiten mit humanen Zellen	69
3.2.1	Zellkultur	69
3.2.2	Hemmung der Glykosylierung in lebenden Zellen	70
3.2.3	Transiente Transfektion	71
3.2.4	Bestimmung der mRNA-Level	73
3.2.5	Proteinbiochemie	74
3.3	Messung von Ca^{2+} -Strömen	79
3.3.1	Elektrophysiologische Messungen: Patch-Clamp	79
3.3.2	Messungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2 AM	80
3.4	Apoptosemessungen	84
3.5	Messungen der Luciferaseaktivität	85
3.5.1	Messungen zum Einfluss von miRNAs	85
3.5.2	Messungen der Promotoraktivität	86
3.6	Signifikanz	86
4	Ergebnisse	87
4.1	Validierung der Glykosylierung von Orai1	87
4.2	Der Einfluss einer Deglykosylierung auf SOCE und I_{CRAC}	90
4.3	Charakterisierung der Glykosylierung von Orai1	90
4.3.1	Quantifizierung der Tunicamycin-bedingten Deglykosylierung auf Proteinebene	92
4.4	Die Sialylierung von Orai1	94
4.4.1	Die Rolle von ST6Gal1	96
4.4.2	Die Sialylierung in verschiedenen Zelltypen	98
4.4.3	Der funktionelle Einfluss von ST6Gal1	98
4.4.4	Inhibition der Golgi-Mannosidase II und der Effekt auf SOCE	103
4.5	Funktionelle Charakterisierung der Orai1-Glykosylierungsmutante	105

4.5.1	Stabile Überexpression von Orai1 _{WT} und Orai1 _{N223A} in Jurkat-T-Zellen und der Einfluss auf SOCE	105
4.5.2	Einfluss von Tunicamycin auf SOCE in stabil Orai1 _{WT/N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen	107
4.5.3	SOCE nach physiologischer Stimulierung von stabil HA-Orai1 _{WT} oder HA-Orai1 _{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen	107
4.6	Expression von Orai1 _{WT/N223A} in CHO _{WT/Lec} -Zellen	109
4.6.1	Einfluss von Tunicamycin auf den speichergesteuerten Ca ²⁺ -Einstrom in CHO _{WT} -Zellen	112
4.7	Der Einfluss von PHA auf den speichergesteuerten Ca ²⁺ -Einstrom	112
4.8	Mögliche Ursachen für die Verstärkung von SOCE und I _{CRAC} durch Deglykosylierung	114
4.8.1	Der Einfluss einer CD95-Stimulation auf den speichergesteuerten Ca ²⁺ -Einstrom	114
4.8.2	Die anteilige Lokalisation von Orai1 an der Plasmamembran	116
4.8.3	Die Multimerisierung von Orai1	116
4.9	Die Interaktion von Orai1 mit glykobindenden Proteinen	118
4.9.1	Die Interaktion von Orai1 mit Siglecs	118
4.9.2	Die Interaktion von Orai1 mit Galektinen	123
4.10	Regulation der Expression von Orai1 und Orai3	125
4.10.1	Die Promotoraktivität von Orai1 und Orai3	125
4.10.2	Einfluss von miRNAs auf die Expression von Orai3	125
5	Diskussion	131
5.1	Validierung der Glykosylierung von Orai1	131
5.2	Der Einfluss einer Deglykosylierung auf SOCE und I _{CRAC}	134
5.3	Charakterisierung der Glykosylierung von Orai1	135
5.4	Die Sialylierung von Orai1	136
5.4.1	Die Rolle von ST6Gal1	137
5.4.2	Die Sialylierung in verschiedenen Zelltypen	137
5.4.3	Der funktionelle Einfluss von ST6Gal1	138
5.4.4	Inhibition der Golgi-Mannosidase II und der Effekt auf SOCE	139
5.5	Funktionelle Charakterisierung der Orai1-Glykosylierungsmutante	140
5.5.1	Stabile Überexpression von HA-Orai1 _{WT/N223A} in Jurkat-T-Zellen und der Einfluss auf SOCE	140
5.5.2	Einfluss von Tunicamycin auf SOCE in stabil Orai1 _{WT/N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen	141
5.5.3	SOCE nach physiologischer Stimulierung von stabil HA-Orai1 _{WT} oder HA-Orai1 _{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen	142
5.6	Expression von Orai1 _{WT/N223A} in CHO _{WT/Lec} -Zellen	142
5.6.1	Einfluss von Tunicamycin auf den speichergesteuerten Ca ²⁺ -Einstrom in CHO _{WT} -Zellen	143
5.7	Der Einfluss von PHA auf den speichergesteuerten Ca ²⁺ -Einstrom	144
5.8	Mögliche Ursachen für die Verstärkung von SOCE und I _{CRAC} durch Deglykosylierung	144
5.8.1	Der Einfluss einer CD95-Stimulation auf den speichergesteuerten Ca ²⁺ -Einstrom	144
5.8.2	Die anteilige Lokalisation von Orai1 an der Plasmamembran	145
5.8.3	Die Multimerisierung von Orai1	146

5.9	Die Interaktion von Orai1 mit glykobindenden Proteinen	147
5.9.1	Die Interaktion von Orai1 mit Siglecs	147
5.9.2	Die Interaktion von Orai1 mit Galektinen	150
5.10	Regulation der Expression von Orai1 und Orai3	154
5.10.1	Die Promotoraktivität von Orai1 und Orai3	154
5.10.2	Einfluss von miRNAs auf die Expression von Orai3	155
Literaturverzeichnis		158
Abbildungsverzeichnis		185
Tabellenverzeichnis		187
Abkürzungsverzeichnis		189

Zusammenfassung

Viele wichtige Prozesse und Funktionen in Immunzellen werden von Ca^{2+} -Signalen gesteuert. Daher ist eine feinabgestimmte Regulation der Kalzium-Signalgebung für ein intaktes Immunsystem von entscheidender Bedeutung. Essenzieller Bestandteil der Ca^{2+} -Signalgebung in Lymphozyten ist der speichergesteuerte CRAC (calcium release activated calcium) -Kanal. Er setzt sich aus porenformenden Orai-Proteinen zusammen und wird durch das Ca^{2+} -Sensor-Protein STIM (stromal interaction molecule) aktiviert. Die Funktion von Proteinen wie STIM1 und Orai1 wird außer durch Expression und Lokalisation oft durch posttranslationale Modifikationen gesteuert, zu denen auch die Glykosylierung gehört. Auch im Immunsystem konnte die Bedeutung der Glykosylierung für die Regulation von Proteinfunktionen bereits in vielen Studien gezeigt werden.

Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung einer potentiellen Regulation der Immunfunktion durch die Glykosylierung des CRAC-Kanalproteins Orai1. In Jurkat T-Zellen wird mittels Fura-2 AM basierter Ca^{2+} -Imaging-Messungen und Patch-Clamp-Analysen gezeigt, dass die Glykosylierung von Orai1 an Asparagin 223 den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom verringert.

Biochemische Analysen wie Westernblot und Lektin-Bindungsstudien zeigen, dass die Glykosylierung von Orai1 zelltypspezifisch ist, wobei mittels qRT-PCR in verschiedenen Zelltypen auch unterschiedliche mRNA-Level für einzelne Sialyltransferasen nachgewiesen werden.

Diese Arbeit zeigt außerdem, dass die im Rahmen von Immun- und Krebserkrankungen oft fehlregulierte ST6Gal1 (β -galactoside α 2,6-sialyltransferase I) an der Sialylierung von Orai1 beteiligt ist und so seine Funktion reguliert.

Als Interaktionspartner für endständige Sialylsäuren kommen unter anderem auch Mitglieder der Siglec-Familie (sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins) in Frage, die durch ihre Interaktion auch die Funktion von Membranproteinen ändern können. Unter den getesteten Kandidaten für eine potentielle Interaktion mit Orai1 zeigt Siglec-8 einen signifikanten Einfluss auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom in HMC1.2-Mastzellen. Zusammen mit den getesteten Einflüssen der Glykosylierung auf Lokalisierung und Aggregationsverhalten des Kanals betrachtet, wird die Siglec-vermittelte Erhöhung des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms vermutlich durch eine verstärkte Retention des Kanals an der Zelloberfläche verursacht.

Als mögliche weitere Interaktionspartner werden auch Galektine identifiziert. Bei Betrachtung aller erhobenen Daten scheint ihr Einfluss auf SOCE jedoch indirekt zu erfolgen.

Das Orai1/Orai3-Verhältnis reguliert viele Eigenschaften des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms. Dazu gehören die Selektivität, das pharmakologische Profil und die Sensitivität gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies.

Um die Regulation der Expression von Orai1 und Orai3 besser zu verstehen, werden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Regulationsmechanismen untersucht. Dabei kann gezeigt werden, dass die unterschiedlichen mRNA-Level der Proteine nicht mit den ermittelten Promotor-Aktivitäten korrelieren. Als möglicher weiterer Regulationsmechanismus wird deshalb auch der Einfluss verschiedener MicroRNAs auf die Expression von Orai3 untersucht. Für MicroRNA hsa-miR-449a wird dabei ein signifikanter Einfluss auf die Expression Orai3-3'UTR-konjugierter Gene gezeigt.

Posttranslationale Modifikationen und die Regulation der Expression durch MicroRNAs stellen sehr unterschiedliche Ebenen der Kontrolle dar. Nur die Kombination aller potentiell möglichen regulatorischen Mechanismen ermöglicht aber das hohe Maß an Feinabstimmung, das Immunzellen dazu befähigt, auf dem schmalen Grat zwischen unzureichender und überschießender Immunantwort zu wandern. Ihre Aufklärung ist insbesondere vor dem Hintergrund der zunehmenden Prävalenz von Autoimmunerkrankungen von besonderer Bedeutung.

Summary

Calcium signals regulate many important functions of immune cells. Fine tuning of calcium signalling is of crucial importance for proper immune responses. An essential part of the calcium signaling cascade is the store operated CRAC (calcium release activated calcium) channel. This channel is constituted of the pore-forming Orai proteins activated by the ER resident sensor molecules STIM (stromal interaction molecule). Several regulatory mechanisms can control protein function, e.g. expression levels, localization and posttranslational modifications such as glycosylation. Various studies demonstrate the regulatory role of glycosylation in the immune response. The aim of this work is to detect and analyse the potential regulation of calcium signalling and immune cell function by glycosylation of Orai1.

Biochemical analysis such as western blot and plant lectin binding assays show that glycosylation of Orai1 is cell type specific. In Jurkat T cells, Fura-2 based calcium imaging assays and patch clamp analysis demonstrate that glycosylation of Orai1 at asparagine 223 decreases calcium influx.

Different cell types differ in expression levels of sialyltransferases as demonstrated by qRT PCR. ST6GA11 (β -galactoside α -2,6-sialyltransferase I) is often dysregulated in immune disease and several types of cancer. This work shows that ST6GA11 adds endstanding sialic acids to the glycan tree of Orai1 and thus regulates its function.

Siglecs (sialic-binding immune globulin like lectins) can bind to such terminal sialic acids and hence can alter the function of membrane proteins. siRNA based knockdown of Siglec-8 significantly elevates store operated calcium entry in HMC cells. This may be caused by direct interaction between Siglec-8 and Orai1, altered retention of Orai1 at the plasma membrane or possibly changes to the Orai1 multimerisation. In addition, this work identifies galectins as potential interaction partners of Orai1. Considering all data, their influence on SOCE seems to be indirect.

As the Orai1/Orai3 ratio determines several properties of store-operated calcium entry, e.g. ion selectivity, pharmacological profile and sensitivity towards reactive oxygen species, this work also investigates Orai1 and Orai3 expression levels through regulation of Orai1/Orai3 promotor activity. However, the promotor activity of Orai1 and Orai3 does not correlate with their mRNA expression levels. As an additional potential mechanism to regulate gene expression, the influence of different miRNAs on the protein synthesis

of Orai3 was examined. miRNA-449a significantly decreases expression of Orai3-3'UTR conjugated genes.

Several regulatory mechanisms allow for precise calcium signaling and consequently the high amount of fine tuning that may enable immune cells to walk the fine line between inadequate and excessive immune responses. Given the increasing prevalence of autoimmune diseases, resolving the mechanism behind this fine-tuning is of special importance. This work demonstrates that both, posttranslational modifications and the miRNA mediated regulation of protein expression are important control mechanisms for CRAC channel function.

Kapitel 1

Einleitung

„Die Bestimmung von Bedeutung und Einfluss einzelner Oligosaccharide in den verschiedensten biologischen Zusammenhängen entspricht der Suche nach einer Handvoll spezieller Glykan Funktionen in einem Heuhaufen von zellulären Kohlenhydratstrukturen. Diese Komplexität hält normalerweise Nicht-Glykobiologen davon ab, den funktionellen Informationsgehalt, der in diesen Zuckermodifikationen verborgen ist, zu entschlüsseln...“

[Moremen et al., 2012].

1.1 Kalzium-Signale

1.1.1 Kalzium

Kalzium (Ca^{2+}) ist ein gründlich erforschter *Second-Messenger* in Lymphozyten, wo er wichtige zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Genexpression und Motilität reguliert. Wie auch in anderen Säugetierzellen, liegt die intrazelluläre zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in unstimulierten, menschlichen B- und T-Lymphozyten bei etwa 50-100 nM, was einem Zehntausendstel der Ca^{2+} -Konzentration im Blutserum entspricht. Dieser steile Konzentrationsgradient bietet die einzigartige Möglichkeit durch das kurzzeitige Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen den zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel innerhalb von Sekunden bis in den Micro-molaren Bereich ansteigen zu lassen, was die Rolle von Ca^{2+} als *Second-Messenger* überhaupt erst ermöglicht [Lewis, 2001].

Zu den Ca^{2+} -Kanälen, die bereits in Lymphozyten identifiziert werden konnten gehören speicher-gesteuerte CRAC (calcium release activated calcium) -Kanäle, sowie P2X Purinrezeptor-Kanäle, TRP (transient receptor potential) -Kanäle und spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle. Wegen der gravierenden Auswirkungen auf das Immunsystem, die ein Ausfall der CRAC-Kanäle nach sich zieht, weist man ihnen eine entscheidende Bedeutung für die T-Zell-vermittelte Immunantwort zu [Feske et al., 2012].

Der Einstrom von Ca^{2+} ins Zytosol erfolgt dabei entweder aus dem Extrazellulär-raum oder dem ER (Endoplasmatisches Retikulum), dessen hohe endoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration durch die Aktivität der SERCA (Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium

ATPase) - Ca^{2+} -Pumpen aufrechterhalten wird [Lytton et al., 1991].

1.1.2 CRAC

Signalkaskade

Die Aktivierung von Immunrezeptoren wie dem T-Zell-Rezeptor (T-cell receptor = TCR) führt über die Aktivierung von Phospholipasen zur Synthese von InsP3 (Inositol-1,4,5-trisphosphat), welches an den InsP3-Rezeptor des ER bindet und so zu einer Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem ER führt. Die daraus resultierende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration ist jedoch nicht ausreichend um langfristige Immunantworten, wie zum Beispiel die Cytokin-Produktion, auszulösen.

Ein langfristiger Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Speicherentleerung ist das erste Mal 1985 von Imboden und Stobo beschrieben worden [Imboden and Stobo, 1985], wobei jedoch kein molekularer Mechanismus der Aktivierung postuliert wurde. Putney schlug daher 1986 ein Modell vor, bei dem die Entleerung der ER- Ca^{2+} -Speicher zu einem andauernden Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran führen sollte, ohne dabei in Abhängigkeit zu Rezeptoraktivierung, der Bildung weiterer Signalmoleküle oder der kurzzeitigen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration nach Speicherentleerung zu stehen [Putney, 1986]. Analog zum Aktivierungsmechanismus wurde der entsprechende Ca^{2+} -Einstrom als „speichergesteuerter Ca^{2+} -Einstrom“ (sore operated Ca²⁺ entry = SOCE) bezeichnet.

Ob dieser Einstrom durch einen elektrophysiologisch zu beschreibenden Ionenkanal oder Transporter - wie zum Beispiel Ionenpumpen - vermittelt wird, war zu diesem Zeitpunkt noch unklar. Zwischen 1992 und 1993 konnte durch die Arbeit mehrerer Gruppen die elektrophysiologische Existenz des speichergesteuerten Kanals in der Plasmamembran von T-Zellen und Mastzellen gezeigt werden, der für den langanhaltenden vermehrten Ca^{2+} -Einstrom (calcium release activated calcium = CRAC) verantwortlich ist [Hoth and Penner, 1992] [Hoth and Penner, 1993] [Zweifach and Lewis, 1993] [Premack et al., 1994].

In Immunzellen ist der kurzfristige (minutenlange) Ca^{2+} -Einstrom unter anderem für die Degranulation von Mastzellen und die Lyse von infizierten oder kanzerogenen Zielzellen durch zytotoxische T-Zellen notwendig. Langfristig (stundenlang) induziert der anhaltende Ca^{2+} -Einstrom fast alle Zellantworten, die durch TCR, B-Zell-Rezeptor (B cell receptor = BCR) und Fc-Rezeptoren ausgelöst werden. Dazu gehören Proliferation und Cytokinproduktion durch T-Zellen oder Mast- und NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) sowie die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und die relative Differenzierung von naiven T-Zellen zu TH1- (Typ1-T-Helfer), TH2- und TH17-Effektor-Subtypen.

Viele dieser langfristigen Prozesse werden durch den Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T cells) reguliert, der in stark phosphoryliertem Zustand im Zytoplasma der ruhenden Zelle vorliegt. Steigt die Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma allerdings an, wird er von der Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin aktiviert

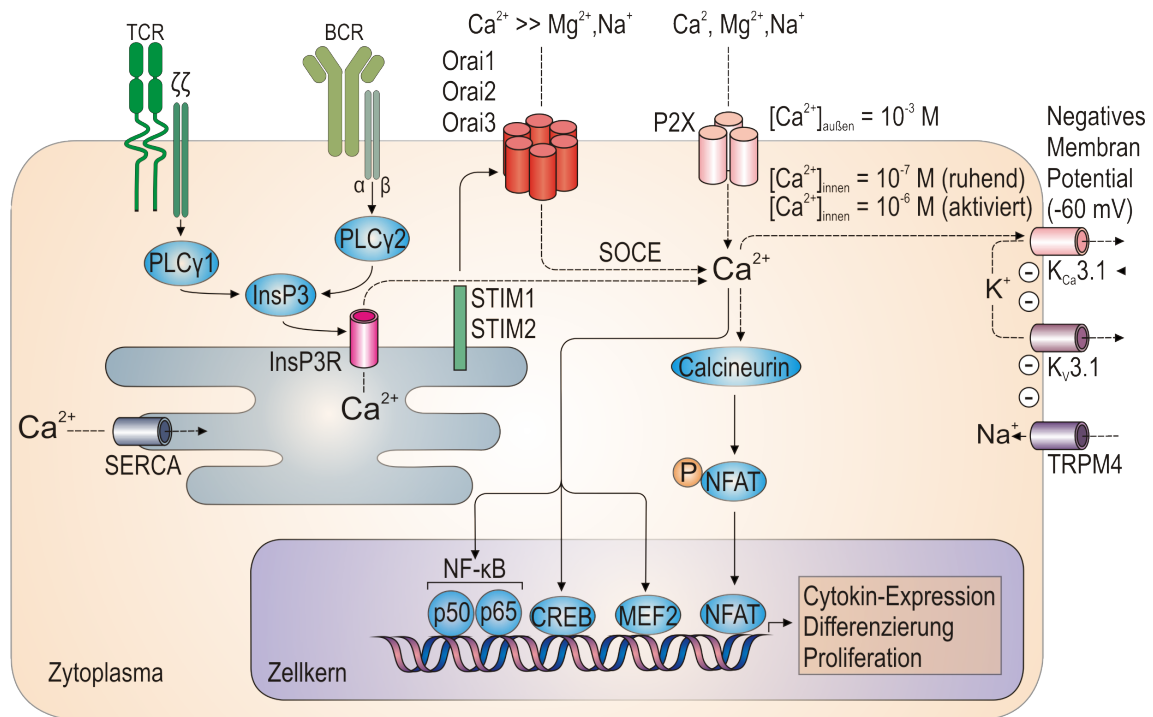


Abbildung 1: Die Regulation der Ca^{2+} -Signalgebung durch Ionenkanäle in Lymphozyten. Speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle werden als Folge einer Antigen-Bindung an die entsprechenden Rezeptoren (TCR oder BCR) aktiviert. Dieser Prozess wird durch Aktivierung der Phospholipase $\text{C}\gamma$ (PLC γ), der Produktion von InsP3 und der Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER durch den InsP3-Rezeptor (InsP3R) vermittelt. Die sich daraus ergebende Aktivierung von STIM1 und STIM2 führt zur Öffnung der Orai1-CRAC-Kanäle und dem speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE). Der langanhaltende Ca^{2+} Einstrom durch die CRAC-Kanäle bewirkt die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Enzyme und Transkriptionsfaktoren, zu denen auch Calcineurin und NFAT gehören. Im Gegensatz zu CRAC-Kanälen werden die nicht selektiven Ca^{2+} -Kanäle P2X4 und P2X7 durch extrazelluläres ATP aktiviert. Der Ca^{2+} -Einstrom in Lymphozyten hängt vom Gradienten zwischen der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($\sim 1 \text{ mM}$) und der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($\sim 0,1 \text{ }\mu\text{M}$) sowie dem Spannungspotential, dass durch zwei K^{+} -Kanäle ($\text{K}_{\text{v}1.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$) und dem Na^{+} -durchlässigen Kanal TRPM4 (transient receptor potential cation channel M4) aufgebaut wird, ab (CREB = cAMP-responsive-element binding protein, MEF2 = myocyte-specific enhancer factor 2, NF- κ B = nuclear factor- κ B) [Feske et al., 2012] (geändert).

und transloziert in den Zellkern [Hogan et al., 2010].

Während in den oben genannten und einer Vielzahl weiterer elektrophysiologischer Studien die Eigenschaften der CRAC-Kanäle bezüglich Selektivität, Inhibierung und der Unterschiede zu den wohlbekannten spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen beschrieben wurden, waren sowohl die Gene, als auch der exakte Aktivierungsmechanismus unbekannt.

Mehrere Aktivierungs-Modelle wie der diffusible Ca^{2+} -Einstrom-Faktor CIF (calcium influx factor) [Csutora et al., 1999], oder die direkte Interaktion zwischen InsP3-Rezeptor und dem CRAC-Kanal („*conformational coupling*“ Modell) [Irvine, 1990], sowie verschiedene Kanal-Kandidaten wie TRPV6 (transient receptor potential channel V6) (CaT1) [Yue et al., 2001] und TRPC1 [Mori, 2002] wurden diskutiert, bis 14 Jahre nach Charakterisierung des Kanals die beiden essentiellen Komponenten des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms STIM und Orai durch RNA-Interferenz-Screens in *Drosophila melanogaster* in Kombination mit den direkten und indirekten Auswirkungen auf SOCE identifiziert werden konnten.

Für die Vermittlung zwischen der Entleerung des ER und dem Ca^{2+} -Einstrom durch die Plasmamembran ist das ER-ständige Protein STIM zuständig. Die Identifizierung von STIM und den Säugerhomologen STIM1 [Roos et al., 2005] und STIM2 [Liou et al., 2005] erfolgte 2005, die Identifizierung von Orai in *Drosophila melanogaster* [Vig et al., 2006b] [Zhang et al., 2006] [Feske et al., 2006] sowie der Säugerhomologe Orai1 [Feske et al., 2006], Orai2 und Orai3 im Jahr 2006 [Zhang et al., 2006], woraufhin durch Mutagenese funktionell wichtiger Aminosäuren und Deletion struktureller Elemente die Rolle von Orai als porenformende Einheit [Yeromin et al., 2006b] [Vig et al., 2006a] und der Mechanismus der Orai1-STIM1-Interaktion als direkte Protein-Protein-Interaktion [Li et al., 2007] aufgeklärt werden konnten (s. Abb. 1)

Die Namensgebung von Orai erfolgte durch Feske et al. entsprechend der griechischen Mythologie nach den Wächtern der Himmelspforte [Stewart, 2005] [Homer, 1990] [Feske et al., 2006].

1.1.3 Orai

Bei den drei Orai-Homologen Orai1, Orai2 und Orai3 handelt es sich um plasmamembranständige Proteine mit 4 Transmembrandomänen, intra- und extrazellulären Loops und zytosolischen N- und C-terminalen Domänen, wobei die Elemente der ersten Transmembrandomäne die zentrale Pore (inklusive Selektivitätsfilter [Shaw et al., 2012]) eines tetrameren oder hexameren speichergesteuerten CRAC-Kanals bilden [Stathopoulos and Ikura, 2014] (s. Abb. 2).

Die verschiedenen Orai-Homologe zeichnen sich durch eine hohe Ca^{2+} -Selektivität und die vermittelten Ströme durch die CRAC-typische, einwärts rektifizierende Strom/Spannungs-Kurve aber unterschiedliche Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken sowie pharmakologische Profile aus, da Orai3 im Gegensatz zu Orai1 und Orai2 nicht durch $50\text{ }\mu\text{M}$ 2-APB inhibiert wird [Lis et al., 2007]. Während Orai1 und Orai3 in fast allen Geweben exprimiert werden, zeigt Orai2 ein limitierteres Expressionsmuster [Gwack et al., 2007].

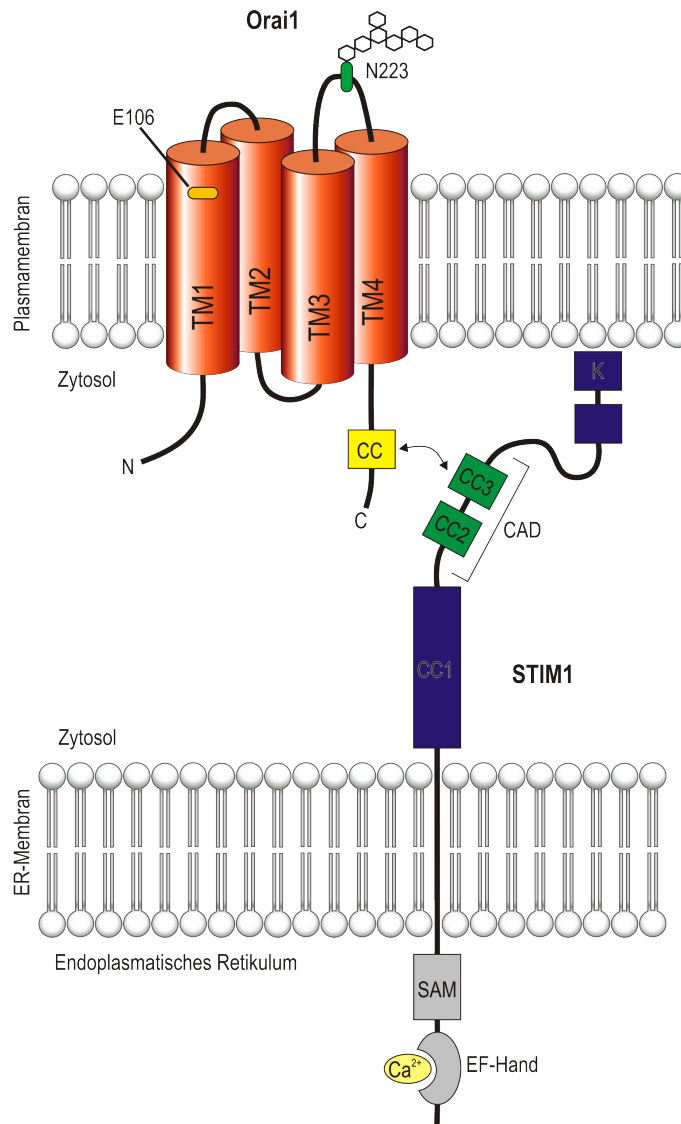


Abbildung 2: **Orai1** bildet die porenformende Untereinheit des speichergesteuerten CRAC-Kanals. Die Orai1-Untereinheit liegt dabei als plasmamembranständiges, glykosyliertes Protein mit vier Transmembrandomänen (TM), intrazellulären N- und C-Termini sowie zwei extrazellulären und einem intrazellulären *Loop* vor. Der zweite extrazelluläre *Loop* enthält an Position 223 den glykosylierungstragenden Asparagin-Rest (N223). Die Kanalpore wird von TM1 gesäumt, wo der Selektivitätsfilter des CRAC-Kanals unter anderem von einem Glutamat-Rest an Position 106 (E106) gebildet wird. Zum intrazellulären Carboxy-Terminus von Orai1 gehört auch die Coiled-Coil (CC) -Domäne, die die Bindestelle für STIM dargestellt. Bei STIM1 und STIM2 (nicht gezeigt) handelt es sich um einspannige Transmembranproteine in der Membran des ER. Ihre N-Termini ragen ins Lumen des ER und enthalten eine Ca^{2+} -bindende EF-Hand-Domäne, die es ihnen ermöglicht die Ca^{2+} -Konzentration des ER zu erfassen. Die zweite und dritte Coiled-Coil-Domäne im C-Terminus von STIM1 sind Teil der CRAC-Aktivierungsdomäne (CAD), die direkt an Orai1 binden, und den CRAC-Kanal aktivieren kann. Eine Lysin (K)-reiche Domäne am Ende des C-Terminus von STIM1 ermöglicht die Rekrutierung zur Plasmamembran [Feske et al., 2012] (geändert).

Orai1-3 zeigen eine hohe Konservierung in den Transmembrandomänen [Cahalan et al., 2007] [Hogan et al., 2010] inklusive der Selektivität-vermittelnden Glutamatreste [Cai, 2007] [Vig et al., 2006a], den intrazellulären N-terminalen und C-terminalen Segmente, die an der STIM1-Orai1 Interaktion beteiligt sind [Cahalan et al., 2007] sowie dem intrazellulären *Loop* zwischen Transmembrandomäne 1 und 2 [Cahalan et al., 2007]. Während alle drei konservierte, putative *Coiled-Coil*-Domänen in ihrem C-Terminus tragen, unterscheiden diese sich deutlich in Bezug auf die Wahrscheinlichkeit einer *Coiled-Coil*-Bildung [Frischauf et al., 2009].

Alle drei Orai-Proteine können sowohl homomere wie auch heteromere Kanäle formen [Lis et al., 2007] [Gwack et al., 2007], wobei sich endogene CRAC-Kanäle meist homogen aus Orai1-Untereinheiten zusammensetzen [Thompson and Shuttleworth, 2013]. Diese können in ruhenden Zellen hauptsächlich als Dimere detektiert werden und nach Aktivierung durch STIM1 Tetramere bilden [Penna et al., 2008], wobei die Tetramer-Struktur durch Kombinations-Experimente mit Orai1-Tandem-Multimeren und der dominant negativen Orai1-Mutante E106Q bestätigt werden konnte [Mignen et al., 2008b], während die kristallographische Aufklärung der Orai1-Porenstruktur auf eine Hexamer-Struktur schließen ließ [Hou et al., 2012].

Orai1

Der wichtigste Kanal der Orai-Familie in menschlichen T-Zellen und essentiell für die Funktion von Lymphozyten ist Orai1. Patienten mit einer *loss-of-function*-Mutation in Orai1 zeigen einen nahezu vollständigen Ausfall des lymphozytären speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms [McCarl et al., 2009].

Die heterologe Expression von Orai1 ermöglicht zudem die Rekonstruktion von CRAC in Orai1-*Knockout*-Mäusen, während die Expression von Orai2 bzw. Orai3 nur zu einer minimalen bis teilweisen Rekonstruktion führt [Gwack et al., 2008]. Die kombinierte Überexpression von STIM1 und Orai1 (aber nicht einzeln [Mercer et al., 2006]) führt in einer Vielzahl von Zelltypen zu Ca^{2+} -Einstromraten, die bis zu 50-100fach über den Werten von endogenen CRAC-Strömen (I_{CRAC}) liegen. Dabei bleiben die charakteristischen biophysikalischen Eigenschaften des von I_{CRAC} zum größten Teil erhalten [Peinelt et al., 2006] [Soboloff et al., 2006b] [Yeromin et al., 2006a].

Orai2

Die Herunterregulation von Orai2 mittels siRNA scheint in vielen Zelltypen keinen Einfluss auf endogene Ca^{2+} Signale zu haben [Baryshnikov et al., 2009] [Takahashi et al., 2007]. Möglicherweise werden durch Orai2 aber kleine APB-sensitive speichergesteuerte Ca^{2+} -Signale vermittelt, die noch nach *Knockout* von Orai1 messbar sind. [Gwack et al., 2008] [Vig et al., 2008].

Orai3

Während alle anderen Vertebraten zwei Orai-Isoformen exprimieren, wird Orai3 nur von Säugetieren exprimiert [Cai, 2007]. Wird Orai1 herunterreguliert, können durch Orai3 weiter speichergesteuerte Ca^{2+} -Signale generiert werden. Solange Orai1 normal exprimiert wird, scheint die Überexpression von Orai3 jedoch keinen Effekt zu haben [Mercer et al., 2006]. Dass die Herunterregulation von Orai3 in Prostatazellen zu einem verstärkten Ca^{2+} -Einstrom führt [Holzmann et al., 2013], könnte darauf hindeuten, dass Orai1-Orai3-Multimere Kanäle mit geringerer Leitfähigkeit bilden, als reine Orai1-Multimere.

Im Vergleich zu Orai1 ist Orai3 weniger anfällig gegenüber zellulären Oxidationsvorgängen, die durch Oxidation meist freier Thiol-Gruppen auch zu Änderungen der Kanalaktivität führen können. Dabei resultiert die geringe Redox-Sensitivität von Orai3 vermutlich aus dem Fehlen des korrespondierenden Cysteins zur Cys195 von Orai1 [Bogeski et al., 2010].

Neben CRAC bildet Orai3 mit Orai1 zusammen im Pentamer einen zweiten speicherunabhängigen Kanal, der als ARC (arachidonate regulated Ca^{2+} channel) bezeichnet wird, die gleichen I/V-Eigenschaften wie CRAC zeigt [Mignen et al., 2008a] [Mignen et al., 2009] und dessen Aktivierung durch Arachidonsäure über die N-terminale Domäne von Orai3 vermittelt wird [Thompson et al., 2010].

Während Orai1 N-glykosyliert ist, fehlt sowohl Orai2 wie auch Orai3 die extrazelluläre Konsensus-Sequenz, an der die Glykosylierung stattfindet [Gwack et al., 2007].

1.1.4 STIM

Die Paraloge STIM1 und STIM2 sind hochkonservierte, einspannige Transmembranproteine, die in vielen Zelltypen exprimiert werden [Williams et al., 2001], wobei die Expression von STIM1 in den meisten Geweben höher ist als die von STIM2 [Oh-Hora et al., 2008]. Beide Isoformen sind größtenteils homolog, mit Abweichungen in den aminoterminalen und carboxyterminalen Bereichen. Die Funktionen von STIM1 und STIM2 unterscheiden sich nur geringfügig, wobei diese Unterschiede entscheidende physiologische Auswirkungen haben.

Beide Isoformen sind hauptsächlich im ER/SR (Sarco-Plasmatisches Retikulum) lokalisiert, wobei etwa 5-30 % von STIM1 in die Plasmamembran integriert sind [Soboloff et al., 2012] [Cahalan, 2009]), während STIM2 auf Grund eines *ER-Retention-Motif* ausschließlich an der ER-Membran lokalisiert ist [Soboloff et al., 2006a].

Im Vergleich zu STIM2 ist die aktivierende Wirkung von STIM1 auf Orai1 deutlich stärker [Bird et al., 2009]. Die höhere Ca^{2+} -Affinität der EF-Hand [Zheng et al., 2011] macht STIM2 allerdings sensitiver gegenüber kleinen Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, was für STIM2 eine Funktion bei der Aufrechterhaltung basaler Ca^{2+} -Level vermuten lässt [Brandman et al., 2007], während STIM1 eine essentielle Rolle beim speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom spielt [Oh-Hora et al., 2008] [Roos et al., 2005].

ER-ständiges STIM1, mit einem Gesamtgewicht von ~ 77 kDa, lässt sich in drei Haupt-

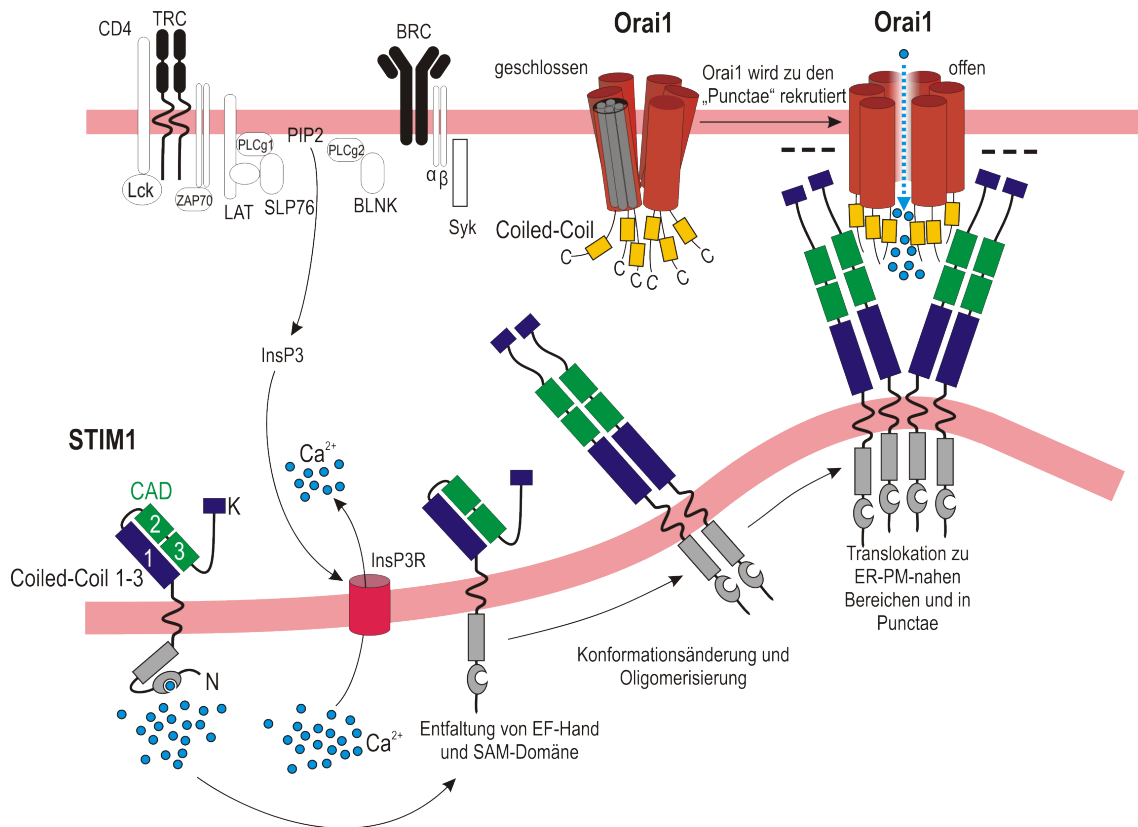


Abbildung 3: Der molekulare Mechanismus der CRAC-Kanal-Aktivierung: In ruhenden Lymphozyten, sind die Ca^{2+} -Speicher des ER gefüllt und Ca^{2+} ist an die EF-Hand der Ca^{2+} -bindenden Domäne im Amino-Terminus von STIM1 oder STIM2 (nicht gezeigt) gebunden. Die Stimulation des TCR oder BCR (nicht gezeigt) führt zur Aktivierung von Antigenrezeptor-induzierten Signalkaskaden und der Produktion von InsP_3 , was über die Bindung an den InsP_3 -Rezeptor (InsP_3Rs) zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führt. Der Abfall der endoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration führt zur Dissoziation des Ca^{2+} von der EF-Hand-Domäne des STIM1, der Entfaltung des N-Terminus und der Multimerisierung der STIM1-Proteine. Diese translozieren zu ER-Plasmamembran-nahen Bereichen. STIM1 formt große *Cluster*, zu welchen die Orai1-Hexamere hin rekrutiert werden, die die funktionelle Einheit des CRAC-Kanals darstellen. Die minimale CRAC-Kanal-Aktivierungsdomäne (CAD) im carboxyterminalen Terminus von STIM1 ist notwendig und ausreichend für die Bindung von Orai1, CRAC-Kanal-Aktivierung und speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom. Diese Domäne enthält zwei Coiled-coil-Domänen (CC), welche mit einer Coiled-coil-Domäne im C-Terminus und zusätzlichen Domänen im N-Terminus von Orai1 (nicht gezeigt) interagieren (LAT = linker for activation of T cell, $\text{PLC}\gamma 1$ = phospholipase $\text{C}\gamma 1$, SAM = sterile alpha motif, ZAP70 = ζ -chain associated protein kinase of 70 kDa) [Feske et al., 2012] (geändert).

domänen gliedern: Der N-Terminus von STIM1 ragt mit etwa 22 kDa (nach Abspaltung der Signal-Sequenz) ins ER-Lumen, ein mittleres Segment bildet die Transmembrandomäne und etwa 51 kDa bilden den zytoplasmatischen Teil des Proteins [Liou et al., 2005]. Der ER-luminale Teil von STIM1 enthält dabei das EF-Hand-Motiv, mit dem STIM1 Ca^{2+} binden kann.

Bei basalen luminalen Ca^{2+} -Konzentrationen von etwa 400 μM liegt STIM1 verteilt im ER vor [Liou et al., 2007] und die EF-Hand-Domäne bildet einen stabilen Komplex mit der SAM (sterile alpha motiv) -Domäne.

Sinkt die luminale Ca^{2+} -Konzentration, dissoziiert Ca^{2+} von der EF-Hand und bewirkt damit eine Entfaltung und Destabilisierung des EF-Hand-SAM-Komplexes [Stathopulos et al., 2006]. Dies induziert eine Konformationsänderung [Muik et al., 2011], Oligomerisierung und Bewegung [Luik et al., 2008] von STIM in plasmamembrannähe (10–25 nm) Bereiche des ER, wodurch eine Interaktion mit Plasmamembranproteinen möglich wird.

Dort akkumuliert STIM in Form von „Puncta“ [Wu et al., 2006]. Die Konformationsänderung entfaltet die C-terminale *Coiled-Coil*-Domäne von STIM1 [Muik et al., 2011] und ermöglicht die Interaktion der C-terminalen Lysin-reichen-Region mit Plasmamembranlipiden [Liou et al., 2007]. Aus der direkten Interaktion der freigelegten CAD-Domäne mit einer *Coiled-Coil*-Domäne im C-Terminus und zu geringerem Anteil auch im N-Terminus von Orai [Muik et al., 2011], wird Orai1, das normalerweise gleichmäßig über die Plasmamembran verteilt ist [Liou et al., 2007], rekrutiert [Park et al., 2009] und aktiviert, was zu einer *Co-Clustering* von Orai und einem lokalen Einstrom von Ca^{2+} an den ER-Plasmamembran-Verbindungen führt [Luik et al., 2006] (s. Abb. 3).

1.1.5 Ca^{2+} -Signale und das Immunsystem

Betrachtet man die schweren, wiederkehrenden Infektionen mit viralen und bakteriellen Pathogenen sowie Pilzen in Patienten mit Mutationen in Orai1 und STIM1, durch die eine SOCE-Funktion nicht länger gewährleistet ist, wird die Rolle, die SOCE für das Immunsystem spielt, besonders deutlich [Feske, 2009].

Neben Zellen des adaptiven Immunsystems, spielt CRAC auch in vielen Zellen des angeborenen Immunsystems wie Neutrophilen [Schaff et al., 2010] und natürlichen Killerzellen eine wichtige Rolle. Ein Defekt in Orai1 oder STIM1 und folglich fehlender SOCE kann schwerwiegende immunologische Funktionsausfälle nach sich ziehen [Le Deist et al., 1995] [Maul-Pavicic et al., 2011]. Wahrscheinlich können die Immundefekte von Patienten mit fehlendem CRAC auf eine Kombination von Defekten im angeborenen und erworbenen Immunsystem zurückgeführt werden [Bergmeier et al., 2013].

Neben der essentiellen Bedeutung der Ca^{2+} -Signalgebung für ein intaktes Immunsystem, gibt es auch Hinweise auf veränderte Ca^{2+} -Signale im Rahmen von Immunerkrankungen. Eine Hauptrolle bei Überempfindlichkeitsreaktionen und allergischen Reaktionen wie Heuschnupfen, Asthma und anaphylaktischem Schock spielen Mastzellen. Die Erkennung von Antigenen triggert über ihren IgE Rezeptor FcεRI einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration

und infolge dessen die Exozytose von Granula mit pro-inflammatorischen Mediatoren [Bergmeier et al., 2013]. Während für Maus-Mastzellen bereits gezeigt werden konnte, dass der FcεRI vermittelte Ca^{2+} -Einstrom über STIM1 und Orai1 vermittelt wird [Vig et al., 2008] [Baba et al., 2008], gibt es auch für menschliche Mastzellen bereits Ergebnisse, die auf eine Beteiligung von SOCE an der Mastzellaktivierung hinweisen [Di Capite et al., 2009].

Versuche in Mausmodellen für Multiple Sklerose konnten zudem zeigen, dass eine Herunterregulation von STIM1 und die dadurch vermittelte verminderte Funktion von Th1 und Th17-Zellen, die für die Produktion pro-inflammatorischer Cytokine wie IFN- γ (Interferon γ) und IL-17A (Interleukin 17A) zuständig sind, eine protektorische Wirkung gegen die Entzündung des zentralen Nervensystems hat [Ma et al., 2010] [Schuhmann et al., 2010].

1.1.6 Ca^{2+} -Signale und Krebs

Eine fehlerhafte Regulation von Ca^{2+} -Kanälen und anderen Molekülen, die an der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt sind [Monteith et al., 2007] inklusive STIM [Sabbioni et al., 1997] [Chen et al., 2011], und Orai [Faouzi et al., 2011], konnte auch in verschiedenen Tumorzelllinien und Krebserkrankungen nachgewiesen werden.

Eine direkte Beteiligung von SOCE wurde nicht nur bei der Kontrolle und Proliferation von Tumorzellen, sondern auch bei der tumorbedingten Neubildung von Blutgefäßen [Chen et al., 2011] und der Regulation von Migration und Einwanderung von Tumorzellen ins Gewebe gezeigt [Yang et al., 2009]. Die Mehrzahl der Studien deutet dabei auf eine proonkogene Wirkung von SOCE hin, wobei auch Hinweise auf eine Tumor-suppressive Wirkung aufgedeckt werden konnten [Flourakis et al., 2010].

1.1.7 Ca^{2+} -Signale und Glykosylierung

Inwieweit Orai1 vermittelte Ca^{2+} -Signale durch Glykosylierung, z.B. der Ca^{2+} -Kanalproteine oder anderer Proteine, die an der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt sind, reguliert werden, ist bisher weitestgehend unbekannt. Während Orai1 eine funktionelle, d.h. extrazellulär gelegene Konsensussequenz aufweist, haben Orai2 und Orai3 keine entsprechenden Glykosylierungsstellen. Die Glykosylierung von Orai1 erfolgt an einem Asparagin-Rest an Position 223, der sich entsprechend der strukturellen Voraussagen im zweiten extrazellulären *Loop* des Proteins befindet.

Die Expression der Orai1-Glykosylierungs-Mutante N223A in SCID-Fibroblasten (SCID = severe combined immunodeficiency) ohne funktionelles endogenes Orai1 konnte zeigen, dass die Glykosylierung weder notwendig für Lokalisierung noch Funktion des Proteins ist. Im Vergleich zu Orai1_{WT} (wildtypischem Orai1) führte die Expression der Glykosylierungs-Mutante Orai1_{N223A} sogar zu einer höheren Rekonstitution des SOCE [Gwack et al., 2007]. Für die unspezifische Deglykosylierung mittels Tunicamycin-Behandlung (Wirkmechanismus

s. Kap. 3.2.2) konnte in Jurkat-T-Zellen ebenfalls eine Steigerung der Ca^{2+} -Einstromrate nach Thapsigargin-induzierter Speicherentleerung gezeigt werden [Czyż et al., 2009].

Sowohl STIM1 wie auch STIM2 enthalten potentielle Glykosylierungsstellen in der ER-luminalen SAM-Domäne [Williams et al., 2002], die für beide Paraloge bereits experimentell nachgewiesen werden konnten [Mignen et al., 2007] [Kilch et al., 2013] [Williams et al., 2001].

Im Gegensatz zu Orai1 [Kilch et al., 2013] ist die Glykosylierung von STIM1 sensitiv gegenüber der Endoglycosidase H (Endo H) und wird somit in ER und Golgi-Apparat nicht zu einem komplexen Glykan prozessiert [Williams et al., 2002]. Abhängig von der Art der Mutation führen Mutationen der Glykosylierungsstellen von STIM1 zu einer Verringerung (QQ, NQ, QN, QD, DD, DN, ND, EQ) oder zu Steigerung (DQ) des Ca^{2+} -Einstromes durch Orai1 [Kilch et al., 2013]. Nach Deglykosylierung durch Tunicamycin zeigt STIM1 zudem eine reduzierte Zelloberflächenexpression [Williams et al., 2002]. Eine funktionelle Bedeutung der STIM2-Glykosylierung wurde bislang noch nicht untersucht.

1.2 Glykosylierung

1.2.1 Begriff der Glykosylierung

Glykosylierung ist ein enzymatischer Prozess, bei dem glykosidische Bindungen zwischen Monosacchariden untereinander oder zwischen Monosacchariden und Proteinen oder Lipiden geknüpft werden. Das daraus resultierende „Glykom“ bezeichnet das gewaltige Repertoire aller Protein- und Lipid-verknüpften Glykane, die zusammen mit Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden eine der vier Grundbausteine aller Zellen darstellen [Marth and Grewal, 2008].

Mit einigen Ausnahmen enthalten alle sekretierten und oberflächenständigen Proteine sowie Lipide einen signifikanten Anteil an kovalent verknüpften Glykanen, so dass die Glykosylierung in einzelnen Fällen mehr als 50 % der molekularen Masse eines Proteins ausmachen kann. Der Anteil an glykosylierten Proteinen in Bezug auf das Gesamt-Proteom wird dabei auf 80-90 % geschätzt [Rabinovich et al., 2012].

Glykosylierung findet hauptsächlich im Lumen des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates statt und die Gesamtheit der produzierten Glykane spiegelt die Zusammensetzung der exprimierten Glykosyltransferasen und Glykosidasen wider [Marth and Grewal, 2008], die für den Aufbau glykosidischer Verbindungen Zuckerreste mit den Akzeptormotiven in Proteinen, Lipiden oder bereits bestehenden Zuckerketten verknüpfen oder abspalten können [Ohtsubo and Marth, 2006].

Die Protein-Glykosylierung umfasst die meist verzweigten N-Glykane und O-Glykane sowie die linearen Glykosaminoglykane [Ohtsubo and Marth, 2006]. Teil des sekretorischen Weges, der für die Synthese von Glykoproteinen zuständig ist, sind auch Acetyl-Transferasen und Sulfo-Transferasen, die Acetyl- und Sulfat-Gruppen an ausgewählte Saccharide bestimmter Oligosaccharid-Ketten anfügen [Klein and Roussel, 1998] [Fukuda et al., 2001]. Darüber hinaus können Glykane auch als Verbindung zwischen Glykosylphosphatidylinosi-

tol-Ankern und Proteinen dienen [Moremen et al., 2012].

Neben der Glykosylierung in ER und Golgi-Apparat (sekretorischer Weg) findet Glykosylierung auch im Zytosol und Nukleus statt, wo vergleichbar mit der Protein-Phosphorylierung OGT-Transferasen (O-linked N-acetylglucosamine transferase) reversible posttranslationale Modifikationen in Form von O-glykosidisch verknüpften β -N-Acetylglucosaminen anhängen [Hart, 1997].

Das glyko-synthetische Potential einer Zelle wird durch eine Vielzahl von Faktoren bestimmt, wozu neben der relativen Expression der einzelnen Enzyme und ihrer Lokalisation auch die Menge an verfügbaren Glykoproteinen, der Transport dieser Glykoproteine und die Verfügbarkeit der entsprechenden aktivierten Zucker in den passenden sekretorischen Kompartimenten gehört [Moremen et al., 2012].

Obwohl die Bedeutung der Glykosylierung schon lange bekannt ist (AB0-Blutgruppen-System), hängt unser Verständnis von Glykomik (alle Zucker einer Zelle oder eines Gewebes) weiter hinter der von Genomik und Proteomik hinterher. Die Begründung dafür liegt in der strukturellen Komplexität von Glykanen und Glykokonjugaten, der Schwierigkeit ihrer Sequenzbestimmung (nur massenspektrometrisch möglich) und der Tatsache, dass die Glykan-Biosynthese nicht durch ein Template festgelegt ist und vorausgesagt werden kann [Bochner and Zimmermann, 2015].

1.2.2 Mechanismen der Glykosylierung

Die meisten Glykane, die gekoppelt an membranständige und sekretierte Proteinen auftreten, sind N-glykosidisch an Asparagin oder O-glykosidisch an Serin/Threonin geknüpft [Moremen et al., 2012].

N-Glykosylierung

N-Glykosylierung (s. Abb. 4) ist die am besten studierte Form der Protein-Glykosylierung und beginnt im ER mit der Übertragung eines bereits synthetisierten Core-N-Glykans von Dolichol auf einen Asparagin-Rest innerhalb einer N-C-S/T-Konsensussequenz. Die Struktur wird durch die beiden Glucosidasen GlcI (glucan endo-1,3- β -D-glucosidase) und GlcII noch im ER zurechtgeschnitten, wo der Vorgang durch das Calnexin-/ Calreticulin-System unterstützt und kontrolliert wird.

Nach abgeschlossener Qualitätskontrolle transloziert das Glykoprotein in den Golgi-Apparat, wo das Glykan zunächst weiter beschnitten wird, um anschließend durch eine Vielzahl von Transferasen mit den verschiedensten Zuckerresten verlängert und verzweigt zu werden. Für die Modifikationen existieren keine Vorgaben [Rabinovich et al., 2012], so dass sie nur von der Verfügbarkeit und Aktivität einzelner Transferasen sowie Substratverfügbarkeit und Substratzugänglichkeit abhängen [Ohtsubo and Marth, 2006].

Eine wichtige Modifikation ist dabei die endständige Anknüpfung von Sialylsäuren, die α -2,3- oder α -2,6-glykosidisch erfolgen kann und entscheidend für eine Vielzahl biologi-

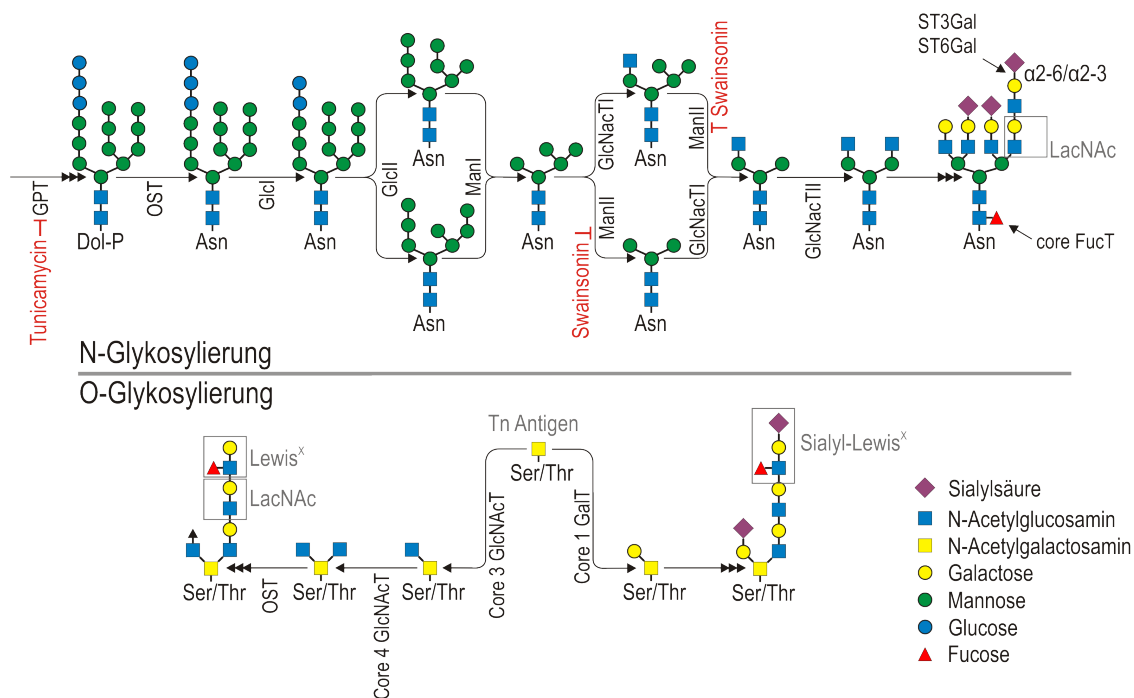


Abbildung 4: **Schematische Darstellung der N- und O-Glykosylierung in Säugetieren.**

(Oben) Die N-Glykosylierung beginnt im ER, wo nach Synthese des Dolichol-verknüpften Vorläuferglykans (durch verschiedene Transferasen wie zum Beispiel GlcNAc-Phosphotransferase (GPT)) dieses *en bloc* von der Oligosaccharyltransferase (OST) auf einen Asparagin-Rest (N) innerhalb der N-X-ST/T-Konsensussequenz übertragen wird. Die Struktur wird noch im ER durch Glukosidasen (Glc I und Glc II) zurecht geschnitten, wo der Faltvorgang durch das Calnexin-/ Calreticulin-System überwacht wird. Nach Abschluss dieser Qualitätskontrolle transloziert das wachsende Glykoprotein zum Golgi-Apparat, wo es zunächst weiter trunkiert und dann von unterschiedlichsten Transferasen (T) durch das Anfügen weiterer Saccharide auf vielfältige Art weiter modifiziert wird. Zu den Schlüsselreaktionen gehört das Anfügen von α -2,3- und α -2,6-verknüpften endständigen Sialylsäuren, die entscheidend für eine Vielzahl biologischer Funktionen sind. Auch das Disaccharid N-Acetylglucosamin (LacNAc) ist eine Schlüssel-Erkennungssequenz für eine Reihe von Glykan-bindenden Molekülen, zu denen auch einige Vertreter der Galektin-Familie gehören. (Unten) Die Serin/Threonin (Ser/Tre) basierte O-Glykosylierung unterscheidet sich von der N-Glykosylierung anhand einer Reihe von Merkmalen: Sowohl die beteiligten Verbindungen, wie auch Enzyme und die resultierenden Strukturen sind sehr unterschiedlich, wenn auch einige Gemeinsamkeiten, wie das Auftreten von LacNAc-Untereinheiten, existieren. Die O-verknüpften Glykane werden in Subgruppen eingeteilt und tragen Namen wie „Tn-Antigen“ und „Sialyl-Lewis^x“, die in der Literatur häufig anzutreffen sind [Rabinovich et al., 2012] (geändert).

scher Funktionen ist. Auch N-Acetylactosamin-Disaccharide, die nicht mit endständigen Sialylsäuren verknüpft sind, stellen wichtige Erkennungssequenzen für eine Vielzahl Glykanbindender Proteine dar, von denen viele zur Familie der Galektine gehören.

Komplexe N-Typ-Glykane zeichnen vor allem die Protein-Glykosylierung in Säugetieren aus. Je weiter man sich in der Evolution zurück bewegt, desto weniger komplex wird die Glykosylierung; auch wenn es auf genomischer Ebene deutlich geringere Unterschiede zwischen den betreffenden Organismen gibt [Rabinovich et al., 2012].

O-Glykosylierung

Glykosaminoglykane sind lineare, O-gekoppelte, saure Polysaccharide, die mit einem konservierten Tetrasaccharid (GlcA- β 1,3-Gal- β 1,3-Gal- β 1,4-Xyl- β ; GlcA = Glucuronsäure, Gal = Galactose, Xyl = Xylose) beginnen und abhängig von der Zusammensetzung ihrer wiederholt auftretenden Disaccharide klassifiziert werden. Glykosaminoglykane können durch Sulfatierung und Epimerisierung weiter modifiziert werden. Glykoproteine mit einer oder mehr Glykosaminoglykan-Ketten werden als Proteoglykane bezeichnet und können sekretiert, transmembranständig oder gebunden an Glykosylphosphatidylinositol vorliegen.

Andere O-gekoppelte Glykane werden anhand ihres einleitenden Monosacharids klassifiziert. Die Kopplung von N-Acetylgalactosamin an Serin/Threonin bildet die Basis für Mucin-typische O-Glykane, während die Kopplung von Mannose als ersten Zucker an Serin/Threonin die Klasse der O-Mannose-Glykane bildet. Neben Serin/Threonin kann die O-Glykosylierung auch an besonders Cystein-reichen Domänen (C-gekoppelte Fucose oder Glucose) beziehungsweise an Tryptophan (O-gekoppelte Mannose), sowie im Fall von Glykogen über Galactose an Hydroxylysin erfolgen [Moremen et al., 2012].

Die O-Glykosylierung unterscheidet sich von der N-Glykosylierung sowohl was die beteiligten Enzyme, wie auch die geknüpften Verbindungen betrifft (s. Abb. 4). Auch die entstehenden Glykane unterscheiden sich deutlich von denen der N-Glykosylierung, wobei man einzelne Motive wie das Disaccharid N-Acetylactosamin in beiden Glykosylierungstypen findet. Bestimmte Motive in O-Glykosylierungen tragen Namen wie „Tn-Antigen“ und „Sialyl-Lewis^x“, die häufig in der Literatur anzutreffen sind [Rabinovich et al., 2012].

Während die Synthese von N-gekoppelten Glykanen im ER beginnt, beginnt die O-Glykosylierung im Golgi-Apparat, wo die Zuckerketten dann ebenfalls verzweigt und schließlich mit Sialylierungen, Sulfatierungen und Fucosylierungen abgeschlossen werden [Moremen et al., 2012].

Neben Proteinen können auch Sphingolipide durch Glykosylierung modifiziert werden. Eukaryotische Zellmembranen sind reich an glykosylierten Sphingolipiden, die zum Teil auch Fucose-Reste und Sialylsäuren enthalten [Moremen et al., 2012].

Ihre chemischen Eigenschaften ermöglichen Kohlenhydraten Oligomere mit einer unübertroffenen strukturellen Variabilität zu bilden. Dank ihrer Fähigkeit sowohl Wasserstoffbrücken-Bindungen sowie C-H/ π -Bindungen auszubilden, kann der „Zuckercode“ durch spezifische Rezeptoren entschlüsselt werden [André et al., 2015].

1.2.3 Glyko-bindende Proteine

Glykane, die auf dem sekretorischen Weg gebildet werden, sind an einer Vielzahl von zellregulatorischen Mechanismen beteiligt. Der Einfluss von Glykanen auf Protein-Protein-Interaktionen umfasst Vorgänge, die von der Faltung reifender Proteine und intrazellulärem *Trafficking*, bis zur Modulation der Zell-Zell-Kommunikation durch Adhäsion, Aufrechterhaltung der Homöostase, Rezeptor-Aktivierung und Signalweiterleitung sowie Endozytose reichen [Ohtsubo and Marth, 2006].

Eine Beteiligung der Glykosylierung findet sich auch bei der Überwachung durch das Immunsystem sowie Entzündungsreaktionen, Autoimmunität und Tumor-Metastase [Moremen et al., 2012].

Der regulatorische Einfluss von Protein-Glykosylierungen wird meistens über die Interaktion mit Glykan-bindenden Proteinen vermittelt, die durch sterische Modulation molekulare Interaktionen modifizieren können oder selbst an der Signalweiterleitung beteiligt sind. Glykan-bindende Proteinen können in zwei Gruppen eingeteilt werden:

Lektine, von denen die meisten zu Familien mit definierten Kohlenhydrat-Erkennungsdomänen gehören und Glykosaminoglykan-bindende Proteine, die meistens sulfatierte Glykosaminoglykane binden [Bochner and Zimmermann, 2015]. Lektine lassen sich in vier Untergruppen einteilen: dazu gehören Proteine vom Typ der C-Typ-Lektine, P-Typ-Lektine, Siglecs (I-Typ-Lektine) und Galektine (S-Typ-Lektine) [Ohtsubo and Marth, 2006], die über bestimmte Sequenz Motive definiert werden [Drickamer and Taylor, 2003] und bei denen es sich mit Ausnahme der Galektine meist selbst um Glykoproteine handelt [Ohtsubo and Marth, 2006].

Außer den P-Typ-Lektinen, die hauptsächlich bei der Beladung von Lysosomen wichtig sind [Dahms, 2002], haben alle anderen Glykan-bindenden Proteine essentielle Funktionen bei der Kontrolle der angeborenen wie auch der erworbenen Immunabwehr [van Kooyk and Rabinovich, 2008].

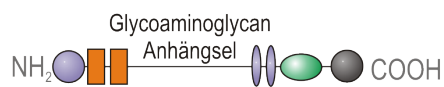
C-Typ-Lektine

In die Gruppe der C-Typ-Lektine werden alle Lektine gezählt, deren Fähigkeit zur Zucker-Bindung Ca^{2+} -abhängig ist. Alle Ca^{2+} -abhängigen Lektine tragen eine gruppeneigene Zucker-Erkennungsdomäne (carbohydrate recognition domain = CRD), die zwischen den Mitgliedern der Gruppe zum Teil hoch konserviert ist (C-type CRD) [Zelensky and Gready, 2005] (s. Abb. 5). Teil der CRD ist ein koordiniertes Ca^{2+} -Ion, das zwei seiner koordinativen Bindungen mit dem Zuckersubstrat ausbildet [Veldhuizen et al., 2011].

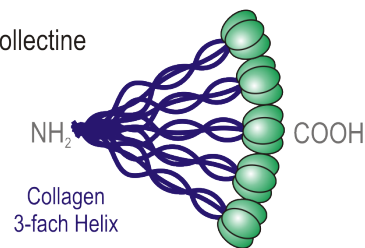
In Vertebraten gibt es 17 Gruppen von Proteinen mit C-Typ-CRD oder CTLD (C type lectin like domain): Leticane (s. Abb. 5A), Asialoglykoprotein- und DC(dentritic cell) -Rezeptoren, Collectine (s. Abb. 5B), Selektine (Sialyl-Lewis^x-bindend) (s. Abb. 5C), NK-Rezeptoren, die Makrophagen-Mannose-Rezeptor-Gruppe, die REG (regenerating gene) -Protein- und Chondrolectin-Gruppe, die Tetranectin-Gruppe, Polycystine, Attraktine,

Lösliche C-Typ Lektine

A Lecticane

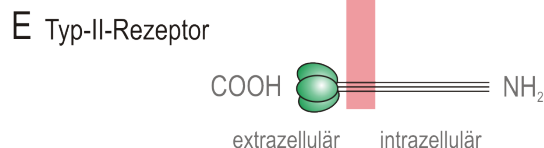
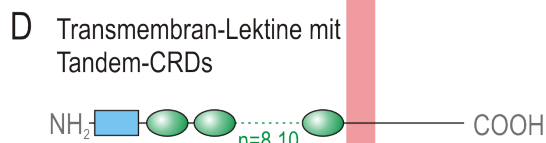
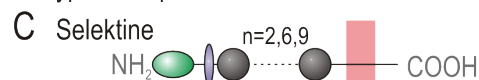


B Collectine



C-Typ Lektine mit Transmembran-Domäne

Typ-I-Rezeptor



- Ig-ähnliche Domäne
- Link-Protein-ähnliche Domäne
- EGF-ähnliche Domäne
- C-Typ-CRD
- Komplement-regulatorische Domäne
- Fibronectin-Typ-II-Domäne

Abbildung 5: **C-Typ-Lektine:** C-Typ-Lektine lassen sich in lösliche C-Typ-Lektine und C-Typ-Lektine mit Transmembrandomänen unterteilen. **A-B:** Zu den löslichen Lektinen gehören zum Beispiel A: Lecticane mit einem Proteoglykan-Kern-Peptid und B: Collectine, die über ihre Collagen-Domäne Oligomere bilden können. **C-E:** Zu den Transmembran-C-Typ-Lektinen gehören unter anderem Typ-I-Rezeptoren wie C: Selektine und D: Transmembran-Lektine mit extrazellulären Tandem-CRDs und intrazellulären C-Termini (Makrophagen-Mannose-Rezeptor-Gruppe) sowie E: Typ-II-Rezeptoren mit CRDs im extrazellulären C-Terminus (Asialoglycoprotein-/NK-Rezeptoren), die ebenfalls oligomerisieren können (geändert nach einer Abbildung von Yasuyuki Imai auf glycoforum.gr.jp).

EMBP (e^osophil major basic protein), DGCR2s (DiGeorge syndrome critical region), die Thrombomodulin-Gruppe, Bimlecs, SEECs (soluble protein containing SCP, EGF, EGF and CTLD domains) und CBCPs (Calx-β and CTLD containing protein), von denen jedoch nicht alle Zucker oder Ca²⁺ binden können [Zelensky and Gready, 2005].

Trotz der teilweise konservierten Zucker-Erkennungsdomäne unterscheiden sich C-Typ-Lektine in ihren Liganden, bei denen es sich um Glykane mit endständigen Mannose- und/oder Fucose-Resten (Glu-Pro-Asn-Motiv) [Figdor et al., 2002] oder auch endständigen Galactose- oder N-Acetyl-Galactosamin-Resten (Gln-Pro-Asp-Motiv) handeln kann [Kawasaki et al., 1986]. C-Typ-Lektine werden entweder als Membranproteine synthetisiert, oder als lösliche Proteine sekretiert. Abhängig von der Orientierung des aminoterminalen Endes, werden Lektine entweder als Typ-I (N-Terminus auswärts) oder Typ-II (N-Terminus ins Zytoplasma) C-Typ-Lektine definiert (s. Abb. 5) [Figdor et al., 2002].

Bei der Gruppe der Selektine handelt es sich um Typ-I C-Typ-Lektine (s. Abb. 5), die im vaskulären Endothel und auf Leukozyten exprimiert werden und eine wichtige Rolle bei der selektiven Adhäsion von Zellen spielen. Bisher wurden drei Selektine identifiziert, die je nach exprimierendem Zelltyp als E-Selektin (Endothelzellen), P-Selektin (Blutplättchen) oder L-Selektin (Leukozyten) bezeichnet werden [Cummings and McEver, 2009].

Variierende Expressionslevel bestimmter Selektine und Selektin-Liganden sind ein potentieller Mechanismus zur bevorzugten Rekrutierung bestimmter Leukozyten an Entzündungsherde. Im Unterschied zu Siglecs besitzt jedes der drei Selektine N-terminale extrazelluläre C-Typ-Lektin-Domänen und eine Epidermale-Wachstumsfaktor-ähnliche-Domäne (epidermal growth factor = EGF) sowie 2-9 wiederholte Konsensus-Motive (Komplement-regulatorische Domänen) statt Immunglobulin-ähnlicher Domänen. Sie tragen außerdem keine intrazellulären Immunorezeptor-Tyrosin-basierten-inhibitorischen-Motive (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs = ITIMs) oder Immunorezeptor-Tyrosin-basierte-aktivierende-Motive (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs = ITAMs) (s. Abb. 5C)[Bochner and Zimmermann, 2015].

Von den Typ-II membrangebundenen C-Typ-Lektinen, von denen bisher 17 aus *Homo sapiens* kloniert wurden, sind die meisten auf Antigen-präsentierende Zellen beschränkt, wobei einzelne auch in NK- oder Endothelzellen gefunden werden konnten [Zelensky and Gready, 2005]. Die meisten C-Typ-Lektine haben Internalisierungsmotive in ihrem zytoplasmatischen Teil und spielen eine Rolle bei der Aufnahme der von ihnen erkannten glykosylierten Antigene [Engering et al., 2002]. Darüber hinaus kann der zytoplasmatische Teil auch inhibitorische oder aktivierende Domänen haben, die Immunantworten positiv oder negativ beeinflussen [Figdor et al., 2002](s. Abb. 5E).

I-Typ-Lektine - Siglecs

I-Typ-Lektine sind nach ihrer Struktur mit mindestens einer Immunglobulin-ähnlichen Schleife zusammengefasst. Die am besten charakterisierte Gruppe der I-Typ-Lektine ist die Siglec (sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins) -Familie [Varki and Angata, 2006].

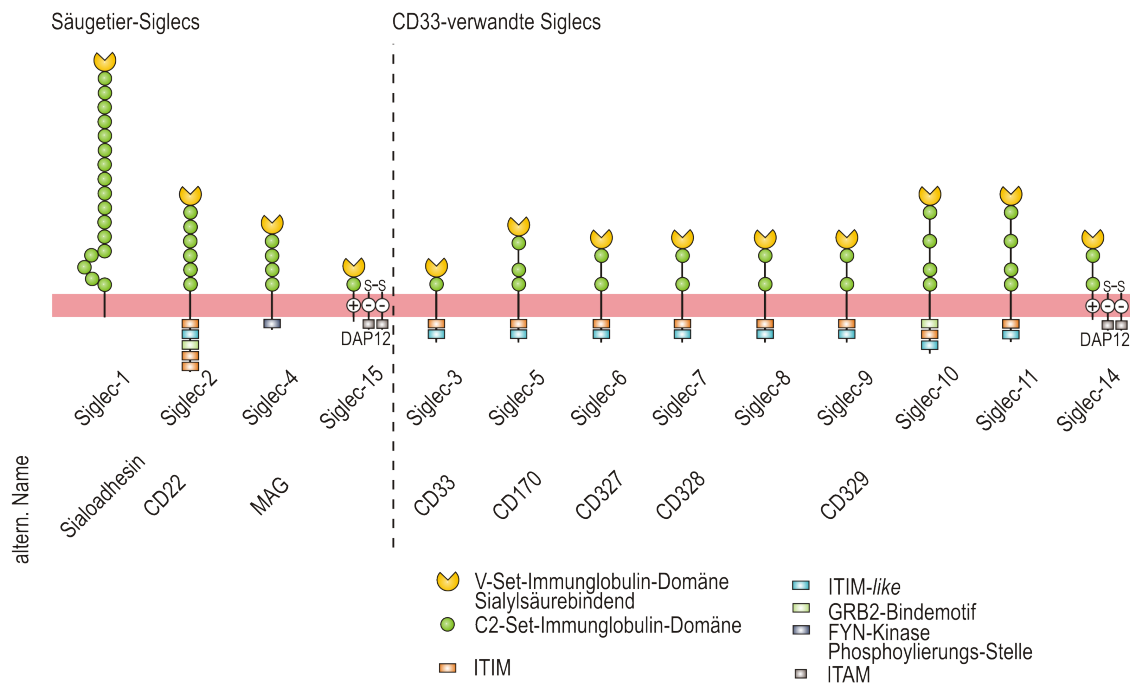


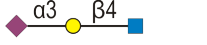
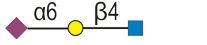
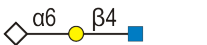
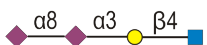
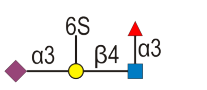
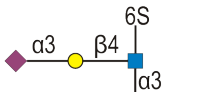
Abbildung 6: **Die Siglec-Familie:** Siglecs enthalten eine aminoterminal Immunglobulin-Domäne, über die die Erkennung der Sialylsäure-Reste vermittelt wird, sowie eine unterschiedliche Anzahl von C2-set-Immunglobulin-Domänen. Die Einteilung der Siglecs in zwei Gruppen basiert auf Sequenzhomologien und evolutionärer Konservierung. Die CD33-verwandten Siglecs sind bezüglich der Sequenz ihrer extrazellulären Regionen sehr ähnlich und enthalten in ihren intrazellulären Domänen oft konservierte Tyrosin-basierte signalgebende Motive (ITIM/ITIM-like/ITAM). Im Gegensatz dazu gibt es in allen Säugetieren auch noch die Orthologen Siglec-1, -2, -4 und -15, die nur eine sehr geringe Sequenzähnlichkeit aufweisen. Über geladene Reste in ihren Transmembrandomänen assoziieren Siglec-14 und -15 mit DAP12, was ihnen über die ITAM-Domänen von DAP12 eine aktivierende Signalgebung ermöglicht (GRB2 = growth factor receptor bound protein 2) [Crocker et al., 2007] (geändert).

Aufbau Bei Siglecs handelt es sich um Typ-I Membranproteine mit einer aminoterminalen V-Set (variable region) -Immunglobulin-Domäne. Die Anzahl der C2-Set (immunoglobulin constant region typ 2) -Immunglobulin-Domänen schwankt zwischen den einzelnen Siglecs.

Auf der Basis ihrer Sequenzhomologie lassen sich die Siglecs in zwei Untergruppen einteilen, von denen die Erste mit Siglec-1, -2, -4 und -15 nur entfernt interne Verwandtschaften ausweist (25-30 % Sequenzübereinstimmung) während die zweite Gruppe der CD33 verwandten Siglecs (Siglec-3, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -14) 50-99 % Sequenzübereinstimmung zeigt [Crocker et al., 2007].

Die meisten Siglecs haben zytoplasmatische Signalmotive, bei denen es sich häufig um ITIMs, die inhibitorische Signale übermitteln und Tyrosin-basierte Wechsel-Motive (immunoreceptor tyrosine-based switch motifs = ITSMs), die auf inhibitorische oder aktivierende Weise wirken können, handelt [Bochner and Zimmermann, 2015]. Einzelne Siglecs (Siglec-14, -15 und -16) assoziieren auch mit anderen Zelloberflächenproteinen wie DAP12 (DNAX activation protein of 12 kDa), die ITAMs enthalten und darüber eine Zell-aktivierende Wirkung vermitteln (s. Abb. 6).

Für den Fall einer Infektion mit Erregern, die sich die inhibitorische Wirkung der Siglecs für eine Umgehung der Immunabwehr ihres Wirtes zu Nutze machen könnten, exprimieren die meisten Menschen Paare von Siglecs mit gleicher Liganden-Spezifität aber unterschiedlichen Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen (Siglec-5, -14, -11 und -16) [Macauley et al., 2014].

	Siglec-2	Siglec-7	Siglec-8	Siglec-9	Siglec-10
	0	+	+	+	+
	+++	+	+	+	++
	+++	+	+	+	+++
	0	+++	+	0	0
	ND	++	+++	0	0
	ND	+	0	+++	+++

◇ N-Glycolylneuraminsäure

◆ N-Acetylneuraminsäure

■ N-Acetylglucosamin

● Galactose

▲ Fucose

Abbildung 7: **Relative Bindungsaffinitäten verschiedener Siglecs** für ausgewählte Sialosid-Sequenzen. Abgebildet ist ein Vergleich der Affinitäten einzelner Siglecs für verschiedene Sialosid-Sequenzen, wie sie in Säugetier-Glykoproteinen und Glykolipiden vorkommen, die aus Glykan-Array und vergleichenden Binde-Experimenten gewonnen werden konnten. Trotz der generell niedrigen Affinität von Siglecs für die häufig vorkommenden Sialosid-Strukturen mit α -2-3- und α -2-6-gekoppelten N-Acetylneuraminsäuren, zeigte die Untersuchung der Bindung einzelner Siglecs für die spezifischen Sialosid-Strukturen, dass jedes Siglec über ein ganz spezifisches Bindeprofil verfügt (+++ = starke Bindung, ++ = mittelstarke Bindung, + = schwache Bindung, 0 = keine Bindung detektierbar, ND = nicht definiert) [Crocker et al., 2007].

Siglec-Bindestellen Das Glykom von Säugern enthält eine Vielzahl von sialylierten Glykanen, die als potentielle Liganden für Siglecs in Frage kommen. Einzelne Siglecs zeigen dabei jedoch eine charakteristische Spezifität für die Erkennung einzelner Sialosid-Strukturen (s. Abb. 7).

Bei Siglec-8 und -9 ist für die Bindung zusätzlich eine Sulfatierung der Erkennungssequenz notwendig [Bochner et al., 2005], wobei die Position der Sulfatierung über die Spezifität entscheidet [Campanero-Rhodes et al., 2006] [Rapoport et al., 2006]. Darüber hinaus unterscheidet sich die Spezifität der Siglecs auch in Bezug auf die verknüpften Sialylsäuren.

Besonders erwähnenswert ist dabei der evolutionäre Verlust von Neu5Gc (N-Glycolylneuraminsäure) beim Menschen, die bei den nahe verwandten „Großen Affen“ (*Hominidae* außer *Hominini*) der bevorzugte Ligand einiger Siglecs ist [Sonnenburg et al., 2004] und eine schnelle Evolution vieler CD33-verwandten Siglecs zur Folge hatte. Möglicherweise ist auch die, im Vergleich zu den „Großen Affen“ ausgesprochen niedrige Expression von

Siglecs in menschlichen T-Zellen, auf dieses evolutionäre Ereignis zurückzuführen [Nguyen et al., 2006].

Siglecs und Immunzell-Rezeptoren Sialylsäuren als Liganden für Siglecs findet man auf Immunzellen, Epithelzellen und Tumorzellen. Selbst Mikroben nutzen die Sialylsäuren von Wirtszellen, um der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen.

Siglecs könnten Sialylsäuren auf der gleichen Zelle (cis) oder anderen Zellen (trans) binden. Die meisten der CD33-verwandten Siglecs modulieren nach Liganden-Bindung mittels ihrer inhibitorischen ITIM- und ITIM-*like*-Domänen und der Rekrutierung entsprechender Phosphatasen [Crocker et al., 2007] und damit Inhibierung der Zell-Aktivierung [Avril et al., 2004] und Proliferation [Vitale et al., 1999], Induktion von Apoptose [Nutku et al., 2003] und der Sekretion proinflammatorischer Cytokine [Lajaunias et al., 2005] das Verhalten der Zelle [Crocker et al., 2007].

Einzelne Siglecs wirken darüber hinaus auch bei der Unterscheidung von Fremd und Selbst, sowie bei der Aktivierung endogener TOLL-*like*-Rezeptoren mit [Crocker et al., 2007]. Neben wirtseigenen Sialylsäuren können Siglecs auch mit Sialylsäuren auf der Oberfläche von Pathogenen interagieren und so Endozytose durch Makrophagen (\leftarrow Siglec-1, Siglec-5) [Jones et al., 2003], sowie die Bindung durch NK-Zellen (natürliche Killerzellen) und Monozyten (\leftarrow Siglec-7) fördern [Avril et al., 2006].

Siglecs in pathophysiologischen Prozessen Die regulierende Funktion von Siglecs im Immunsystem wird besonders im Kontext mit Autoimmunerkrankungen deutlich.

Dabei scheint zum einen die fehlende Regulation von Eosinophilen und evtl. auch Mastzellen und Basophilen durch Siglec-8 zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber allergischem Asthma zu führen [Gao et al., 2010] [Nutku et al., 2003], zum anderen gibt es auch Hinweise auf eine potentielle Vorbeugung von Entzündungen und neurotoxischen Effekten durch die Expression von Siglec-3 auf Mikrogliazellen [Malik et al., 2013]. Siglec-14 hingegen scheint sich durch seinen aktivierenden Einfluss auf Neutrophile negativ auf den Krankheitsverlauf der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung auszuwirken [Angata et al., 2013].

Eine besonders wichtige Rolle bei der Regulation des Immunsystems kommt Siglec-2 zu, das durch seine inhibitorische Wirkung auf den BCR [Collins et al., 2006] [Macauley et al., 2013], die Stimulation und Expansion selbstreaktiver B-Zellen und damit die Entstehung von Autoantigenen verhindert [Goodnow et al., 2005].

Auch die Aktivierung von T-Zellen kann durch Siglecs in beide Richtungen gesteuert werden. Dabei führt die Interaktion mit Siglec-1 auf Makrophagen zu einer erhöhten Apoptose-Rate in regulatorischen T-Zellen, die den entsprechenden Siglec-1-Liganden exprimieren [Wu et al., 2009] [Kidder et al., 2013]. Siglec-10 hingegen, kommt durch die CD52-vermittelte Inhibierung der TCR-Phosphorylierung und damit Unterdrückung der T-Zell-Antwort eine anti-inflammatorische Wirkung zu [Bandala-Sanchez et al., 2013].

Auch wenn Siglecs in eine ganze Reihe von immunregulatorischen Vorgängen involviert zu sein scheinen, sind die beteiligten Signalkaskaden vieler dieser regulatorischen Vorgänge, sowie ein mögliches Mitwirken an intrazellulären Ca^{2+} -Signalen noch nicht untersucht.

Die immunregulatorische Funktion von Siglecs kann von Krebszellen auch zu ihrem Vorteil eingesetzt werden. Da die inhibitorischen Siglecs (Siglec-7 und -9) von NK-Zellen exprimiert werden, können sich Tumorzellen durch Expression der entsprechenden Liganden auf ihrer Zelloberfläche oder von Mucinen (strukturegebender Bestandteil des schützenden Schleimes von Schleimhäuten) die inhibitorische Wirkung zu Nutze machen, um der NK-Zell-vermittelten Anti-Tumorantwort zu entgehen [Jandus et al., 2014] [Belisle et al., 2010].

Wegen der Vielzahl pathophysiologischer Prozesse an denen Siglecs beteiligt sind, bieten sie auch ein breites Spektrum für therapeutische Ansätze. Erste Erfolge konnten hier bereits mit Siglec-8-Antikörpern zur Einleitung von Siglec-8-induzierter Apoptose in Eosinophilen und damit reduzierter Pathologie bei allergischer Rhinitis [Kim et al., 2013], Eosinophiler Ösophagitis [Rubinstein et al., 2011] und dem Umbau von Lungengewebe bei allergischem eosinophilem Asthma (*airway remodeling*) sowie Allergen-induzierter entzündlicher Darmerkrankung [Song et al., 2009] gezeigt werden.

Die Aufklärung der molekularen Mechanismen bei der funktionellen Regulation von Immunzellen durch Siglecs ist also zum Verständnis und als Basis für therapeutische Ansätze in Bezug auf Autoimmunerkrankungen sowie *Immunescape* bei der Tumorentwicklung von besonderer Bedeutung.

Galektine

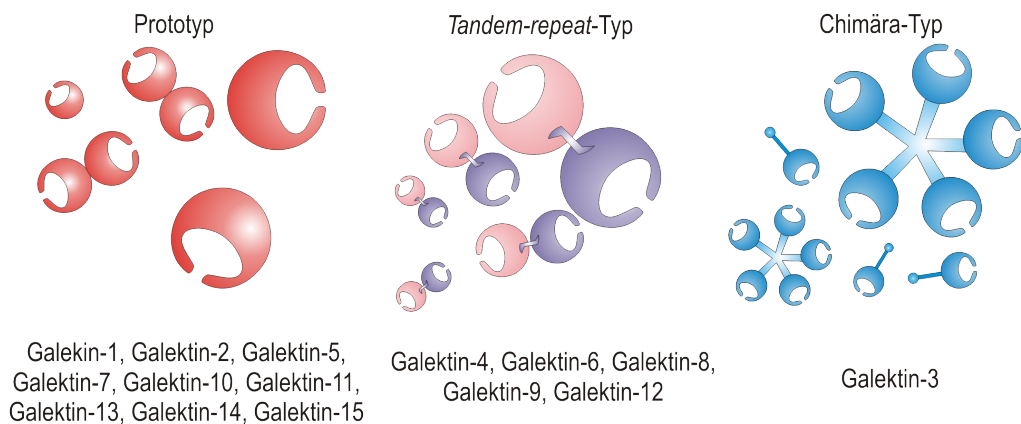
Im Gegensatz zu C-Typ-Lektinen und Siglecs, bei denen es sich meistens um Membran-assoziierte Rezeptoren handelt, gehören Galektine zur Kategorie der löslichen immunmodulatorischen Proteine, die entweder intrazellulär Signalkaskaden modulieren, oder extrazellulär regulatorisch wirken können [Rabinovich and Toscano, 2009].

Mitglieder der evolutionär konservierten Galektin-Familie binden alle das Disaccharid N-Acetyllactosamin (Gal- β 1,3GlcNAc oder Gal- β 1,4GlcNAc; Gal = Galactose, GlcNAc = N-Acetylglucosamin) [Hirabayashi, 2002], das häufig auf N- oder O-verknüpften Glykanen von Rezeptoren oder anderen glykosylierten Matrixproteinen vorkommt [Rabinovich and Toscano, 2009].

Dabei unterscheiden sich die einzelnen Familienmitglieder auf Grund ihrer Binde-Präferenz; abhängig von Verzweigung, der Anzahl an Wiederholungen der Disaccharid-Grundstruktur und der Modifikation der endständigen Zucker (Sialylierung oder Fucosylierung) [Hirabayashi, 2002].

Man unterscheidet Prototyp-Galektine (Galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -14, -14, -15) mit nur einer Zuckerbindungsdomäne (carbohydrate recognition domain = CRD), *Tandem-Repeat*-Galektine (Galektin-4, -6, -8, -9) mit zwei homologen CRDs und Galektin-3 mit einer CRD gebunden an eine nicht-Lektin-N-terminale Region, die zuständig für die

Struktur und Klassifizierung



Galektin-Glykan-Lattices

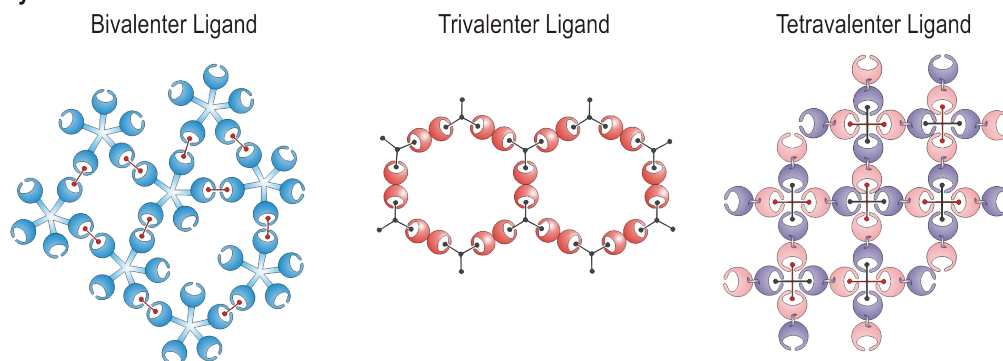


Abbildung 8: **Strukturen von Galektinen und Galektin-Glykan-Interaktionen:** (Oben) Schematische Struktur und Klassifizierung verschiedener Mitglieder der Galektin-Familie. Galektine können in drei Gruppen unterteilt werden: Prototyp-Galektine, die eine Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne (carbohydrate recognition domain = CRD) enthalten und Homodimere bilden können, *Tandem-Repeat*-Typ-Galektine, die zwei verschiedene CRDs in einem Tandem enthalten und durch einen Linker verbunden sind, der aus bis zu 70 Aminosäuren besteht und das einzigartige Chimära-Typ Galektin-3, bei dem die CRD mit einer nicht-Lektin-aminoterminalen Region aus oft wiederholten Prolin-Glycin-Alanin-Tyrosin-Motiven verbunden ist. Nach der Bindung eines Liganden vollzieht Galektin-3 eine Konformationsänderung, die es ihm erlaubt zu Pentameren zu oligomerisieren. (Unten) Schematische Darstellung der verschiedenen *Lattices*, die hypothetisch von multivalenten Galektinen und multivalenten Glykanen ausgebildet werden können [Rabinovich and Toscano, 2009].

Oligomerisierung von Galektin-3 ist [Sato et al., 2009]. Während Galektine mit nur einer CRD als Dimere existieren, kann Galektin-3 Pentamere formen. Die meisten Galektine sind in der Lage durch ihre Bindung an multivalente Glyko-Konjugate geordnete Gitterstrukturen zu bilden, die als *Lattices* bezeichnet werden [Schattner, 2014] (s. Abb. 8).

Galektin-1, -3, -8 und -9 findet man auf vielen hämatopoetischen Zellen sowie Endothelzellen [Yang et al., 2008] [Cattaneo et al., 2014] [Rabinovich et al., 2002], während Galektin-2, -4, -7 und -9 auf verschiedenen Epithelzellen exprimiert werden. Galektin-12 hingegen findet man fast nur in Fettgewebe [Yang et al., 2008].

Galektine regulieren viele zellphysiologische Vorgänge wie Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und Apoptose [Di Lella et al., 2011], spielen eine wichtige Rolle in intrazellulären Signalkaskaden [Garner and Baum, 2010] und sind außerdem an der Zellzykluskontrolle [Liu et al., 2002] beteiligt. Diese Vorgänge sind bei einer Reihe von biologischen Prozessen wie Embryogenese, Angiogenese, Neurogenese und Immunität besonders wichtig und sowohl bei Tumorgenese, Neurodegeneration und Entzündungsprozessen gravierend verändert [Laderach et al., 2010].

Die Vielzahl der Galektin-regulierten Prozesse ermöglicht ihnen ihre Rolle bei der Modulation von B-Zell-Reifung, Aktivierung und Differenzierung [Rabinovich and Toscano, 2009], bei der Homöostase von T-Helfer-Zellen, Aufrechterhaltung der Fetomaternalen Toleranz und Suppression von Autoimmunreaktionen. Auch an der Aufrechterhaltung einer immunsuppressiven Umgebung um Tumorgewebe scheinen Galektine beteiligt zu sein [Liu and Rabinovich, 2010].

Galektine vermitteln ihre Funktion dabei meist durch Bindung und Quervernetzung von glykosylierten Rezeptoren in den *Lattices*, um so durch Organisation der Zelloberfläche eine Feinjustierung der Rezeptor-Liganden-Interaktion zu erreichen [Boscher et al., 2011] [Brewer, 2002].

Während die Bindung von Galektinen oft zur Induktion von Apoptose führt, wird auch eine Reihe nicht-apoptotischer Rezeptoren durch eine Galektin-Bindung moduliert. Zu den Rezeptoren, die auf diese Weise beeinflusst werden, gehören TCR und BCR [Rabinovich and Toscano, 2009], wobei Galektin-3 im Falle des TCR vorzeitiges Rezeptor-*Clustering* und damit eine zu niedrige Aktivierungsschwelle des Rezeptors verhindert [Demetriou et al., 2001]. B-Zellen hingegen benötigen die Galektin-1-vermittelten *Lattices* für die korrekte Bindung des pre-BCR an Stromazellen und damit die Reifung zur Plasmazelle [Gauthier et al., 2002] [Rossi et al., 2006].

Bei der Modulation von Immunantworten durch Apoptose-induzierende Signalgebung wird die Anfälligkeit einzelner Subtypen durch differenzielle Glykosylierung modifiziert. Der relative Beitrag einzelner Subtypen zur Immunantwort wird so verändert, wobei Fehlregulationen zur Autoimmunität führen können [Toscano et al., 2007].

Galektine können ihre Lektine auch in einem Kohlenhydrate-unabhängigen Prozess binden, der oft bei intrazellulär lokalisierten Galektinen vorkommt, wo die meisten Liganden-Bindungen über Protein-Protein-Interaktionen ablaufen [Rabinovich et al., 2012].

Wie bei vielen immunregulatorischen Prozessen kann auch die Galektin-Glykan vermittelte Modulation der Immunantwort von Tumorzellen genutzt werden, um der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen. Dabei können durch die Galektin-1-vermittelte Apoptose Lymphozyten-Population zu Gunsten weniger aggressiver Subtypen verschoben werden, während die Überexpression von Galektin-9 das Auftreten von Suppressor-Zellen fördert und so ebenfalls Anti-Tumor-Antworten unterdrückt. Durch Expression von Galektin-3 werden T-Zellen gleichzeitig in einem nicht-reaktiven Stadium gehalten [Rabinovich et al., 2012]. Zusätzliche anti-apoptotische Funktionen und eine verstärkte ras-abhängige Signaltransduktion, können dabei auch durch intrazellulär exprimierte Galektine vermittelt werden [Schultz et al., 2012].

Ähnlich der Modulation durch Siglecs sind viele der molekularen Mechanismen, die über eine Galektin-Interaktion vermittelt werden, kaum aufgeklärt. Sie bieten auf Grund ihrer Beteiligung an pathophysiologischen Vorgängen wie Autoimmunität und Tumorgenese sowie ihrer Subtypspezifität ebenfalls attraktive therapeutische Ziele.

1.2.4 Glykosyltransferasen

Ungefähr 700 Proteine werden benötigt, um das komplette Repertoire an Säugetier-Glykanen zu produzieren, die aus lediglich 10 verschiedenen Monosacchariden aufgebaut sind. Bei 200 dieser Proteine handelt es sich um Glykosyltransferasen, die Glykan-Strukturen durch Nukleotid- oder Lipid-gebundene Zucker aufbauen und verlängern.

Der Wettbewerb zwischen konkurrierenden Glykosyltransferasen, die gleiche Glykan-Akzeptormotive, aber unterschiedliche Donorspezifitäten haben, beeinflusst die relative Anzahl einzelner Glykan-Strukturen im Gesamt-Glykom [Nairn et al., 2008] [Schachter, 2000] [Moremen et al., 2012]. Dieser Wettbewerb und die relative Ineffizienz der enzymatischen Reaktion resultiert oft in einem vielfältigen Ensemble verzweigter Glykan-Strukturen (Mikroheterogenität) auch an den gleichen Glykosylierungsstellen in ansonsten identischen Proteinen [Schachter, 1991] [Moremen et al., 2012].

Die hohe Diversität der Glykan-Modifikationen kann dazu führen, dass Modifikationen an einer einzigen Glykosylierungs-Stelle in einem spezifischen zellulären Kontext eine veränderte Funktion zur Folge haben, in einem anderen Kontext jedoch einen anderen oder keinen Effekt zeigen [Moremen et al., 2012]. Im Laufe von Aktivierung und Differenzierung der Immunzellen, kann die Glykosylierung dramatischen Veränderungen unterworfen sein, was die Bildung und Maskierung spezifischer Kohlenhydrat-Liganden für endogene Lektine zur Folge hat [Marth and Grewal, 2008] [van Kooyk and Rabinovich, 2008].

Sialyltransferasen

Wegen ihrer negativen Ladung und weil sie oft endständige und exponierte Positionen auf Zelloberflächenmolekülen einnehmen, gehören Sialylsäuren zu den Schlüssel-Strukturen von Oligosacchariden, die eine Vielzahl biologischer Prozesse steuern.

Gebundene Sialylsäuren beeinflussen nicht nur die Konformation von Glykoproteinen und Glykolipiden [Kaufmann et al., 1999] sondern vermitteln durch ihre physikalischen Eigenschaften und der Erkennung durch intrinsische Rezeptoren auch viele wichtige Zellfunktionen [Varki, 2007] [Schauer, 2009].

Sialylsäuren dienen als Signal zur „Selbst“-Erkennung durch das Immunsystem [Pangburn et al., 2000] [Varki and Angata, 2006] [Crocker et al., 2007] und sind, bedingt durch ihre Lage und Vielzahl (Dutzende bis Hunderte von Millionen Kopien pro Zelle), Interaktionspartner vieler extrinsischer Rezeptoren und einer Reihe von Pathogenen [Varki, 2007] [Varki, 2010]. Darüber hinaus können sie aber auch Bindungsmotive maskieren und dadurch die Erkennung durch den entsprechenden Rezeptor verhindern [Schauer, 1985].

Die beiden am häufigsten vorkommenden Sialylsäuren in den meisten Säugetier-Zellen sind Neu5Gc und Neu5Ac (N-Acetylneuraminsäure) [Varki, 2001]. Im Gegensatz zu ihren nächsten evolutionären Verwandten, den „Großen Affen“, sind Menschen jedoch nicht zur Synthese von Neu5Gc in der Lage, da die notwendige Hydrolase kurz vor der Entstehung der Gattung *Homo* durch eine einzige Mutation im *CMAH*-Gen funktionslos wurde [Varki, 2010]. Aufgenommen mit der Nahrung kann nicht-menschliches Neu5Gc aber dennoch in menschliches Gewebe eingebaut werden [Li and Chen, 2012].

Sialylsäuren können durch O-Acetylierung und weniger häufig O-Lactylierung, O-Methylierung, oder Sulfatierung, und O-Phosphorylierung an den Hydroxylgruppen von C-4, C-5, C-7, C-8, und/oder C-9 einfach oder mehrfach modifiziert werden [Angata and Varki, 2002] [Schauer, 2001], was zu mehr als 50 strukturellen Varianten in der Natur geführt hat [Schauer, 2009], wobei die Modifikationen speziens- und gewebeabhängig, sowie entwicklungsphysiologisch reguliert sind [Yu and Chen, 2007].

Durch das menschliche Genom werden 20 verschiedene Sialyltransferasen kodiert. Sie unterscheiden sich in Bezug auf die katalysierte Bindung (α -2-3, α -2-6, α -2-8), das modifizierte Glykan (O-Glykan, N-Glykan, Glykolipid) und das präferierte Zuckersubstrat [Bi and Baum, 2009]. Wie die meisten Gene wird auch die Expression der Sialyltransferasen zelltypspezifisch reguliert [Harduin-Lepers et al., 2001]. An der N-Glykosylierung sind auch die Sialyltransferasen ST3GalIII (β -galactoside sialyltransferase), ST3GalIV, ST3GalVI und ST6GalII, ST6GalIII beteiligt, wobei nur für ST3GalIII, ST3GalIV und ST6GalII die Expression in T-Zellen nachgewiesen werden konnte [Bi and Baum, 2009].

Wegen der einhergehenden Änderungen in Protein-Funktion und -Faltung wird abnormale Glykosylierung als Ursache für eine Vielzahl von Krankheiten betrachtet. Dazu gehören auch verschiedenste Krebserkrankungen, in denen eine veränderte Glykosylierung der Zelloberfläche, besonders in Bezug auf endständige Strukturen, die Invasivität und damit das Fortschreiten der Krebserkrankung unterstützt [Christiansen et al., 2014].

Die am häufigsten vorkommende Sialylverbindung bei Säugetierzellen ist die α -2-3-glykosidische Verbindung während α -2-8- und α -2-6-glykosidische Verbindungen deutlich seltener nachgewiesen werden können [Hennet et al., 1998].

ST6Gal1 Wegen der gravierenden Defekte bei Funktion und Entwicklung verschiedener Immunzellen, die ST6Gal1 (β -galactoside α -2,6-sialyltransferase I) -defiziente Mäuse zeigen [Marino et al., 2008] [Nasirikenari et al., 2006] [Hennet et al., 1998], ist ST6Gal1 für das Immunsystem von besonderer Bedeutung.

Dabei ist die Regulation der ST6Gal1-Expression in einzelnen Geweben sehr unterschiedlich [Paulson et al., 1989] [O’Hanlon et al., 1989] und dynamisch [Toscano et al., 2007] reguliert, was sich besonders während der Differenzierung und Aktivierung verschiedener Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen [Liu et al., 2011], T-Zellen [Toscano et al., 2007] und dendritischer Zellen [Videira et al., 2008] zeigt. Durch Einfluss auf apoptotische Signale kann die Sialylierung dabei direkt an der Differenzierung selbst beteiligt sein [Toscano et al., 2007].

Für die zelltypspezifische Transkription der ST6Gal1-mRNA können verschiedene Promotorregionen dienen. Die multiplen, resultierenden mRNA-Varianten unterscheiden sich in ihrem 5’-Bereich, teilen aber alle die gleiche kodierende Region. Nach Expression kann die Proteinfunktion zusätzlich durch Phosphorylierung oder N-Glykosylierung moduliert werden [Harduin-Leperc et al., 2001] [Ma et al., 1999].

ST6Gal1 katalysiert hauptsächlich die Verknüpfung von Sialylsäuren mit endständigen Galactose-Resten von Gal β 1-4GlcNAc-Disacchariden über α -2-6-glykosidische Bindungen. Daraus entstehen Neu5Ac α -2-6Gal β 1-4GlcNAc-Glycane die man auf N-glykosidischen Proteinen und zu einem geringeren Anteil auch auf O-glykosidischen Proteinen, Glykolipiden und freien Oligosacchariden findet [Petit et al., 2010]. Rekombinant exprimiert, zeigt die humane ST6Gal1 in eukaryotischen Zellen eine breite Spezifität gegenüber Substraten mit endständigen Gal(NAc) β 1-4GlcNAc-Motiven (Gal = Galactose, GalNAc = N-Acetylgalactosamin, GlcNAc = N-Acetylglucosamin, Neu5Ac = N-Acetylneuraminsäure) [Rohfritsch et al., 2006].

1.2.5 Bedeutungen der Glykosylierung

Glykosylierung und Alterung

Durch altersabhängige Defekte in vielen Immunzellen ist das Immunsystem gealterter Mäuse und Menschen nicht mehr in der Lage auf Pathogene und Impfstoffe angemessen zu reagieren.

Sie sind in T-Zellen am deutlichsten ausgeprägt und meist die Ursache für unvollständige zellvermittelte und flüssigkeitsvermittelte Immunantworten [Sadighi Akha and Miller, 2005]. Die T-Zell-Antworten in älteren Individuen sind normalerweise langsamer und von geringerer Amplitude, sowohl in Bezug auf Cytokin-Produktion, Induktion der Cytokin-Rezeptoren [Thoman and Weigle, 1981], Aktivierung von Zellzyklusgenen [Buckler et al., 1988], Aktivierung von Ca^{2+} -Signalen [Grossmann et al., 1991] und Aktivierung von Proteinkinase-Kaskaden [Miller et al., 1997]. Dabei scheint auch der relative Anteil von CD4- und CD8-Zellen, die noch eine immunologische Synapse ausbilden können, abzunehmen

[Yang and Miller, 1999] [Tamir et al., 2000] [Garcia and Miller, 2001] [Sadighi Akha and Miller, 2005].

Mit Hilfe biochemischer Analysen und Lektin-Bindungsstudien konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Glykosylierung und Alterung hergestellt werden, da Alterung zu einer ausgeprägten Modifizierung des Glykosylierungsmusters von naiven und Memory-T-Zellen führt [Garcia et al., 2005].

Eine weitere Aufklärung der Regulation von Ca^{2+} -Signalen in T-Zellen insbesondere im Kontext mit Glykosylierung könnte mit dazu beitragen, den Mechanismus der eingeschränkten T-Zell-Antwort gealterter Zellen zu entschlüsseln [Sadighi Akha and Miller, 2005].

Glykosylierung in pathophysiologischen Zuständen

Änderungen der Zelloberflächen-Glykosylierung im Laufe der Entwicklung von Tumoren wurden schon sehr früh als Schlüsselmerkmal von Tumorzellen erkannt und sind keineswegs zufällig. Spezielle Gruppen von Oligosacchariden häufen sich an der Oberfläche von Tumorzellen an und lassen so auf einen funktionellen Beitrag zum Tumorphänotyp schließen.

Viele der Glykosyltransferasen, die diese Oligosaccharide synthetisieren, werden dabei als Antwort auf Onkogene wie ras hochreguliert [Varki et al., 2009] [Fuster and Esko, 2005] [Schultz et al., 2012].

Auf der Fähigkeit von Glykanen Zell-Zell- und -Matrix-Interaktionen zu kontrollieren, sowie Struktur und Funktion individueller Glykoproteine zu verändern, basiert vermutlich auch der Einfluss von Glykosylierung auf typische Eigenschaften metastatischer Zellen wie Migration, Invasion, Streuung im Blutgefäß- und Lymphsystem, Entkommen der Immunüberwachung und Widerstand gegen Apoptose [Schultz et al., 2012].

Eine Erhöhung der α -2-6-Sialylierung durch die ras-induzierte, gesteigerte Expression von ST6Gal1 [Dall’Olio and Chiricolo, 2001a] [Varki and Varki, 2007] oder anderer ST6GalNAc Familienmitglieder [Gessner et al., 1993] [Dall’Olio et al., 1989] konnte in vielen Tumortypen beobachtet werden, wobei die Hochregulation mit erhöhtem metastatischem Potential und schlechter Prognose korreliert [Schultz et al., 2012] [Zhuo and Bellis, 2011] [Dall’Olio and Chiricolo, 2001b] [Dall’Olio et al., 2014].

Einer Reihe von Studien gelang dabei sowohl *in vitro* [Zhu et al., 2001] [Lin et al., 2002], wie auch in Tiermodellen [Bresalier et al., 1990] [Harvey et al., 1992] einen Einfluss der ST6Gal1-Überexpression auf Migration und Invasion zu zeigen. An diesem Mechanismus scheint vor allem die Familie der Integrin-Rezeptoren beteiligt zu sein, wobei der Interaktion zwischen Integrin und Collagen eine besondere Rolle zukommt [Seales et al., 2005] [Schultz et al., 2012].

Da die verstärkte Sialylierung zur Inhibierung der Galektin-abhängigen Apoptose führt [Schultz et al., 2012] wird die Glykosylierung von Tumorzellen auch zur Vermittlung anti-apoptotischer Signale genutzt. Zusätzlich werden apoptotische Signale weiterer Todes-

rezeptoren wie Fas, und TNFRI (tumor necrosis factor receptor I) durch α -2-6 Sialylierung unterbunden [Swindall and Bellis, 2011] [Liu et al., 2011].

Neben erhöhter Sialylierung konnten auch verstärkte β -1-6-Verzweigungen und erhöhte Vorkommen von Kern-Acetylglucosamin-Resten, sowie eine verstärkte Expression der verantwortlichen Enzyme GnT-V (β -1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V) und GnT-III (β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III) in Tumorzellen nachgewiesen werden. Auch diese scheinen mit Metastase und Migration in Verbindung zu stehen [Christiansen et al., 2014].

Die verstärkte Sialylierung lässt sich in einigen Tumortypen auch auf den Ausfall des Substratkonkurrenten COSMC (core 1 β 3-Gal-T-specific molecular chaperone) zurückführen [Ju et al., 2008] und führt zu kurzen O-gekoppelten Glykanen, die auch als Sialyl-Tn bezeichnet werden [Schultz et al., 2012] und möglicherweise an einer Interaktion mit Siglecs beteiligt sind [Brinkman-Van der Linden and Varki, 2000].

Obwohl die veränderte Glykosylierung ein konsistentes Merkmal von Tumorzellen ist, steht die Aufklärung der Zusammenhänge zwischen Glykosylierung und Tumorphänotyp am Anfang. Viele der Mechanismen scheinen dabei über ein verändertes Migrationsverhalten, die Umgehung apoptotischer Signale und die negativ immunoregulatorische Funktion von Siglecs vermittelt zu werden. Viele der beteiligten Glykoproteine wurden allerdings noch nicht identifiziert.

Neben dem Beitrag von Siglec-Sialylsäuren-Interaktionen zu Autoimmunerkrankungen (s. Kap. 1.2.3) können auch noch andere Glykan-Strukturen an der Entstehung von autoreaktiven Immunzellen beteiligt sein. Während die Aktivität der GnT-V in Tumorgewebe oft gesteigert ist, führt ein Defekt der Mgat5 bei Mäusen (mannosyl (α 1,6)-glycoprotein β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V) durch die abgeschwächte Galektin-Bindung zu einem erhöhten TCR-*Clustering* und damit verstärkten Autoimmunreaktionen in Niere und Gehirn [Demetriou et al., 2001].

Der schmale Grat auf dem sich auch die glyko-vermittelte Regulation des Immunsystems zwischen pathologischen Zuständen bewegt, wird an diesem Beispiel besonders deutlich und unterstreicht die Bedeutung, welche die Aufklärung der molekularen Mechanismen als Basis für die Suche nach therapeutischen Zielproteinen hat.

Glykosylierung im Immunsystem

Während antigenpräsentierende Zellen des angeborenen Immunsystems Lektin-Glykan-Interaktionen nutzen um zwischen nicht-„Selbst“, verändertem „Selbst“ und „Selbst“ zu unterscheiden [Rabinovich et al., 2012], hat die Glykosylierung auch auf viele Rezeptoren des erworbenen Immunsystems einen regulatorischen Einfluss, der oft über Siglecs (BCR-Aktivierung), Galektine (TCR-Signalgebung, T-Zell-Homöostase) und Selektine (*Homing* von Lymphozyten [Lowe, 2003]) vermittelt wird. Dadurch können Zellfunktionen in differenzierten und undifferenzierten Zellen durch Sialylierung auf unterschiedliche Art und Weise reguliert [Videira et al., 2008] und so subtypspezifische Funktionen ermöglicht werden.

Während antigenpräsentierende Zellen des angeborenen Immunsystems Lektin-Glykan-Interaktionen nutzen um zwischen nicht-„Selbst“, verändertem „Selbst“ und „Selbst“ zu unterscheiden [Rabinovich et al., 2012], hat die Glykosylierung auch auf viele Rezeptoren des erworbenen Immunsystems einen regulatorischen Einfluss, der oft über Siglecs (BCR-Aktivierung), Galektine (TCR-Signalgebung, T-Zell-Homöostase) und Selektine (*Homing* von Lymphozyten [Lowe, 2003]) vermittelt wird. Dadurch können Zellfunktionen in differenzierten und undifferenzierten Zellen durch Sialylierung auf unterschiedliche Art und Weise reguliert [Videira et al., 2008] und so subtypspezifische Funktionen ermöglicht werden.

Wie die meisten Zellen sind auch Immunzellen für viele ihrer Funktionen auf die regulierte Aktivität von Ionenkanälen angewiesen. Während durch geladene Sialylsäuren induzierte Konformationsänderungen in der spannungssensitiven Domäne und dadurch veränderte Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken hauptsächlich für spannungsgesteuerte Kanäle eine Rolle spielen, können Glykane auch durch Stabilisierung bestimmter Kanalkonformationen [Baycin-Hizal et al., 2014], Beeinflussung von *Clustering*, Multimerisierung [Erler et al., 2006], Turnover [Gong et al., 2002] [Khanna et al., 2001] und/oder Oberflächenretinierung [Cha et al., 2008] [Leunissen et al., 2013] weiteren modulatorischen Einfluss auf die Kanalfunktion ausüben.

1.3 Regulation der Genexpression durch miRNAs

Neben der Regulation durch posttranslationale Modifikationen kann der funktionelle Einfluss eines Proteins auch durch eine Kontrolle der Genexpression gesteuert werden. Ähnlich wie siRNAs regulieren auch miRNAs (MicroRNAs) die Genexpression auf der posttranslationalen Ebene. Die Sequenzen für die einzelsträngigen, etwa 22 nt (Nucleotide) langen, nicht-kodierenden RNA-Moleküle können in Introns oder Exons von kodierenden Regionen, sowie in nicht-kodierenden Bereichen vorkommen [Kim and Nam, 2006].

Nach Transkription der miRNA-Sequenz im Nukleus faltet sich das primäre miRNA-Transkript in eine Sekundärstruktur, die eine bis mehrere Haarnadelstrukturen enthält [Lee et al., 2002] und durch die Ribonuklease Drosha erkannt und trunziert wird. Produkt dieser Prozessierung ist eine *stem-loop*-Vorläufer miRNA (pre-miR) die aus etwa 60-70 nt besteht [Lee et al., 2003] und nun ins Zytoplasma transportiert wird. Dort erfolgt in einem zweiten Schritt der Prozessierung durch Dicer die Verkürzung zu einem RNA-Duplex von etwa 20-22 nt Länge [Lee et al., 2002] [Lund et al., 2004], der in einen RISC (RNA-induced-silencing-complex) eingebaut wird. Während einer der beiden Stränge degradiert, bildet der andere die reife miRNA [Schwarz et al., 2003].

Über partielle Komplementarität kann die miRNA ihre Ziel-mRNA erkennen und den RISC-Komplex zum entsprechenden Transkript bringen [Filipowicz et al., 2008]. Die Bindungsstärke zwischen miRNA und der Zielsequenz hängt dabei vom Grad der Komplementarität ab, die in der sogenannten *Seed*-Sequenz am 5'Ende (Nukleotid 2-7)

oft besonders hoch ist. Die Bindung der miRNA erfolgt normalerweise an die 3'UTR (3' untranslatierte Region) wobei weniger häufig auch Bindungen an die 5'UTR vorkommen [Bartel, 2009]. Die Bindung von RISC führt schließlich zur Inhibition der Translation beziehungsweise Degradation der Ziel-mRNA und in Folge dessen, zu einer verringerten Proteinbiosynthese [Guo et al., 2010] (s. Abb. 9).

Eine miRNA kann die Expression mehrerer Gene regulieren und jedes Gen von mehr als einer miRNA reguliert werden. Da die Expression und Prozessierung der miRNAs selbst engmaschig kontrolliert wird, machen miRNAs eine noch feinere Abstimmung der Proteinbiosynthese möglich [Lewis et al., 2003].

Der prozentuale Anteil miRNA-regulierter Gene wird mittlerweile auf bis zu 50 % geschätzt [Krol et al., 2010]. Angesichts ihrer bedeutenden Rolle bei der Regulation vieler physiologischer Vorgänge wird eine fehlgesteuerte Expression von miRNAs mit der Entstehung und dem Fortschreiten von Krankheiten wie Krebs, Autoimmunität und chronischen Virusinfektionen in Verbindung gebracht [Rossi et al., 2011] [Xiao and Rajewsky, 2009] [Kroesen et al., 2014].

Neben der Wirkung auf die zelleigene Proteinbiosynthese der miRNA-produzierenden Zelle (Eltern-Zelle) können miRNAs auch durch den extrazellulären Raum in andere Zellen übertragen werden und tragen so zur Zell-Zell-Kommunikation bei. Durch die Verpackung in Exosomen, Mikrovesikel und *apoptotic bodies* sowie Lipoproteine (high- /low-density lipoprotein = HDL, LDL) oder gebunden an Proteine wie Argonaut vor Nukleasen geschützt, konnten miRNAs bereits in Plasma, Urin und Speichel nachgewiesen werden und stellen wegen der passiven Sekretion bei Stress, Verletzung und Nekrose sowie verändertem Expressionsprofil im Rahmen verschiedener Erkrankungen interessante Biomarker dar [Rayner and Hennessy, 2013].

1.3.1 miRNAs im Immunsystem

Je nach Entwicklungs- und Funktionsstatus der Immunzelle werden miRNAs unterschiedlich hoch exprimiert [Rossi et al., 2011]. Nach ersten Experimenten, die den Einfluss von miRNAs auf die Entstehung und Reifung von B-Zellen zeigen konnten [Chen et al., 2004] [Xiao and Rajewsky, 2009], wurde vor allem durch Experimente zur Inaktivierung von Dicer deutlich, welche entscheidende Bedeutung miRNAs für die Entwicklung und Differenzierung von T-Zellen [Cobb et al., 2005] [Cobb et al., 2006] und B-Zellen [Koralov et al., 2008] [O'Carroll et al., 2007] haben. In vielen Studien konnten seither die spezifischen Rollen von miRNAs im Immunsystem [Xiao and Rajewsky, 2009] insbesondere bei Entwicklung und Differenzierung von T-Lymphozyten gezeigt werden [Kroesen et al., 2014].

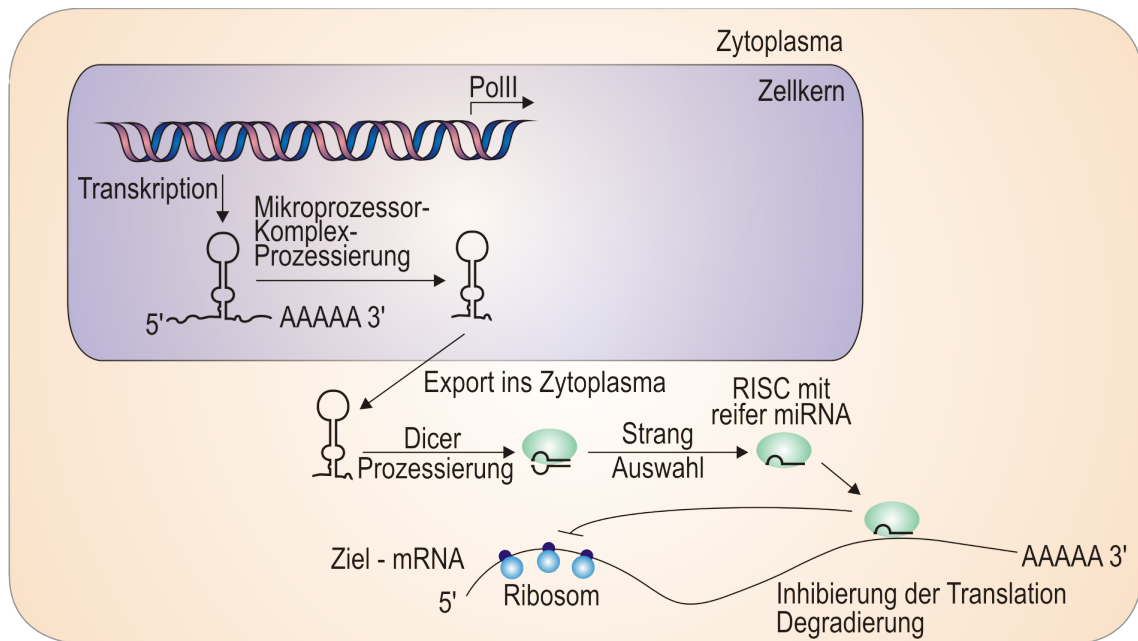


Abbildung 9: **Biogenese von microRNAs (miRNAs):** miRNAs werden von der Polymerase II (PolII) als lange, primäre miRNA-Transkripte (pri-miRs) transkribiert, die Haarnadel-ähnliche Strukturen bilden. Diese Strukturen werden durch den Mikroprozessor-Komplex erkannt und von Drosha zu kleineren (~60-70 nt) Haarnadel-Strukturen trunkiert, die als precursor-miRNA (pre-miR) bezeichnet werden. Die pre-miR wird ins Zytoplasma transportiert und dort einer weiteren Prozessierung durch Dicer unterzogen, welches die endständige Schleife entfernt und einen miRNA-5p-miRNA-3p-Duplex zurücklässt. Nach Eingliederung in den RNA-induced silencing complex (RISC) wird der RNA-Duplex aufgewunden und einer der beiden miRNA-Stränge abgebaut. Zurück bleibt die einzelsträngige, reife miRNA, die den RISC-Komplex zur entsprechenden Ziel-mRNA führen kann. Die Bindung des RISC-Komplexes an das Ziel-Transkript führt zur Inhibition der Translation oder Degradation der mRNA und in Folge dessen zu einer verminderten Proteinsynthese [Kroesen et al., 2014].

Kapitel 2

Materialien

2.1 Antikörper

2.1.1 Primäre Antikörper

Tabelle 1: **Verwendete Antikörper** unter Angabe von Spezifität, Typ, Hersteller, Bestellnummer und Verdünnung

Antikörper	Spezifität	Typ	Hersteller	Bestellnr	Verd.
α -Apo1.1	monoklonal	Maus	Enzo	ALX-805-022	
α -Calnexin	polyklonal	Hase	Assay design	SPA865	1:2000
α -GAPDH	polyklonal	Hase	cell signaling	2118	1:2000
α -Galectin-1	polyklonal	Hase	GeneTex	GTX116411	1:5000
α -Galectin-3	polyklonal	Hase	Biorbyt	orb10686	1:100
α -Galectin-9	monoklonal	Maus	Biolegend	650701	1:500
α -HA (3F10)	monoklonal	Ratte	Roche	11867423001	1:1000
α -Orai1	polyklonal	Hase	Abcam	ab78471	1:500
α -Orai1	polyklonal	Hase	Anaspec	54653	1:500
α -Orai3	polyklonal	Hase	Sigma	HPA015022	1:100
α -Stim1	monoklonal	Maus	BD-Bioscience	610954	1:250
α -ST6Gal1	polyklonal	Ziege	R&D Systems	AF5924	1:250

2.1.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2: **Verwendete Sekundäre-Antikörper** unter Angabe von Hersteller, Bestellnummer und Verdünnung

Antikörper	Hersteller	Bestellnr	Verd.
α -Maus	Amersham Bioscience	NA931	1:500
α -Hase	GE Healthcare Amersham	NA9340	1:25000
α -Ratte	Sigma	A5795	1:40000
α -Ziege	Promega	V8051	1:10000

Alle verwendeten Sekundärantikörper waren an Meerettich-Peroxidase gekoppelt.

2.2 Bakterienstämme

Tabelle 3: **Verwendete Bakterienstämme** unter Angabe des Herstellers

Bakterienstamm	Hersteller
XL-1 Blue Subcloning Grade	Stratagene

2.3 Chemikalien

Tabelle 4: **Verwendete Chemikalien** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
2-Mercaptoethanol	Acros Organics	125472500
2-Propanol	Sigma	19516
Blockreagenz	Böhringer Mannheim	1093657
Dinatriumhydrogenphosphat	J.T. Barker	0303
Denhards Lösung	Invitrogen	750018
Dynabeads Human T Activator CD3/CD28	Life Technologies	xx
Acrylamid-Bisacrylamid	Sigma	A7168
Agar Select	Sigma	A5054
Agarose broad range	Roth	T846.3
Agarose GTQ	Roth	6352.4
Albumin, Bovine Serum	Sigma	A6003
Ampicillin	Sigma	A9393
APS	Sigma	248614-56
Avidin-HPR	BioLegend	405103
Benzonase	Sigma	E1014-5KU
Borsäure	Sigma	B6768
Calciumchlorid	Merck	102382
Cäsiumchlorid	Biomol	02450
Cäsium-BAPTA	Invitrogen	B1212
Glucose	Merck	102382
Glutaminsäure	Sigma	G1626
Complete Proteinase-Inhibitor	Roche	05892791001
DMSO	Sigma	D8418
DTT	Sigma	D9779
EDC Hydrochlorid	Fluka	034509
EDTA	Sigma	ED2SS
EGTA	Sigma	E4378.2506
Ethanol (absolut)	Sigma-Aldrich	32205
EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin	Thermo Scientific	800-874-3723
Fura-2-AM	Invitrogen	F1221
Geneticin	Biontex	A3707
Glycin	Applichem	R030
Hefeextrakt	Difco	212750
HEPES	Sigma	H7523
Holo-Transferrin	Sigma	T0665

Tabelle 4: **Verwendete Chemikalien** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
Inositol-3-Phosphat	Calbiochem	407137
Kaliumchlorid	AnalaR	46764298
Magermilchpulver	Sucofin	
Magnesiumchlorid	Merck	105833025
Methanol	Fisher Chemical	M3950
Methylimidazol	Sigma	M5,083-4
Natriumazid	Sigma	S8032
Natriumchlorid	Sigma	S9888
Natriumhydroxid	Sigma	S8045
Oligo dT-Primer	Life Technologies	18418-012
Passive Lysis Buffer	Promega	E194A
PeqGold dNTPMix	Peqlab	20-3011
PeqGreen DNA/RNA Dye	Peqlab	37-500
Polyornithin	Sigma	P3655
Protein A	Sigma	P 6031
PVA (30 000 – 70 000)	Sigma	P-8136
PVA (146 000 – 186 000)	Sigma	363065
SDS	Acrosorganics	327315000
Sigmacote	Sigma	SL2
Thapsigargin	Invitrogen	T7458
TEA-HCl	Sigma	T2265
TEMED	Sigma	T9281
Tricin	Roth	6977.4
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth	3580.2
Triton X-100	Eurobio	18774
Trizma	Sigma	T1503
Trizol	Life Technologies	15596018
Trypton	Sigma	T9410
Tween 20	Sigma	P1379
UT32P	Hartmann Analytics	STP210
Urea	Sigma	U5378

2.4 Größenstandards

Tabelle 5: **Verwendete Größenstandards** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Größenstandard	Hersteller	Bestellnummer
1 Kb Plus Ladder	Invitrogen	10787-018
Precision Plus Protein Dualcolor Standard	Bio-Rad	161-0325

2.5 Laborgeräte

2.5.1 Messplatz-Komponenten

Verwendete Filter im Bio-Imager

Tabelle 6: **Verwendete Filter im Bio-Imager** unter Angabe der Wellenlängenspezifikation

	Wellenlängenspezifikation
Exzitation	460/10
Emission	570/Long Pass Filter
Dichroid Fura/TRITC Dual Band	510/40 600/60

Verwendete Komponenten am Imaging-Messplatz

Tabelle 7: **Verwendete Komponenten am Imaging-Messplatz** unter Angabe des Herstellers

Gerät	Hersteller
UV-Lampe X-cite 120	Exfo
Olympus IX70	Olympus
Polychrom V	Till Photonics
CCD Kamera T.I.L.L. Imago	T.I.L.L. Photonics GmbH

Tabelle 8: **Verwendete Filter am Imaging-Messplatz** unter Angabe von Emitter, Beamsplitter und Exziter

Emitter	Beamsplitter	Exziter
HQ 525/50	Q495LP	HQ 470/40
HQ 610/75	Q570LP	HQ 545/30

Verwendete Komponenten am Patch-Clamp-Messplatz

Tabelle 9: **Verwendete Komponenten am Patch-Clamp-Messplatz** unter Angabe des Herstellers

Gerät	Hersteller
Axio Observer A1	Zeiss
Mikromanipulator SMI	Luigs und Neumann
Patch Clamp Amplifier EPC 10 USB	HEKA

Verwendete Filter im Cell-Observer

Tabelle 10: **Verwendete Filter im Cell-Observer** unter Angabe von Bezeichnung und Wellenlängenspezifikation des Emissions- und Excitationsfilters

Bezeichnung	Emissionsfilter	Excitationsfilter
38 HE GFP	525/50	470/40
45 HQ Texas Red	630/75	560/400

Alle Komponenten des Cell Observer wurden von der Firma Zeiss bezogen. Für FRET wurde der Dichroid-Spiegel des 45 HQ Texas Red (Durchlass ab 495 nm) verwendet.

2.5.2 Sonstige verwendete Laborgeräte

Tabelle 11: **Verwendete Geräte** unter Angabe des Herstellers

Gerät	Hersteller
BioImager BD Pathway™855	BD
Bio-Photometer	Eppendorf
CFX96 Real-Time System	Bio-Rad
ChemiDoc TM XRS	Biorad
Gelelektrophorese Mini-Protean Tetra Cell	Biorad
Heizblock	Bioer
Hybridisierungssofen UM 400B Hyb	Bachhofer
Inkubationsschüttler Minitron CH-4103	Infors HT
Inkubationsschüttler Unimax 1010	Heidolph
Mastercycler Personal 5332	Eppendorf
Platereader GENios Pro	Tecan
Phosphoimager™-Typhoon	Amersham Bioscience
Semi Dry Blotter	StarLab
Storage Phosphor Screen	Amersham Bioscience
Stromquelle Power Pac HC	Biorad
Sub-cell Agarode Gel Elektrophorese Systems	Biorad
Thermomixer Univortemp	Universal Labortechnik
Vortex Thriller	Peqlab
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich
Zentrifuge Mikro 220R	Hettich
Zentrifuge Mini Spin 5452	Eppendorf

2.6 Lösungen

2.6.1 Patch-Lösungen

Tabelle 12: **Zusammensetzung der verwendeten Externen Patch-Lösungen** sortiert nach Versuch (Stoffangaben mM)

Versuch	E6.1 + Lactose	E6.1 + PHA	HMC1.2 + NaClO ₃	CHO _{WT/Lec}
NaCl	120	120	120	120
KCl	2,8			
MgCl	2	2	2	2
CaCl ₂	20	20	20	10
HEPES	10		10	10
Glucose	10		30	32
TEA-Cl		10	10	10
pH	7.2	7.2	7.2	7.2
mOsm	350	350	350	296

Tabelle 13: **Zusammensetzung der verwendeten Internen Patch-Lösungen** sortiert nach Versuch (Stoffangaben mM)

Versuch	E6.1 + Lactose	E6.1 + PHA	HMC1.2 + NaClO ₃	CHO _{WT/Lec}
NaCl		8		
MgCl	3	3	3	3
HEPES	10	10	10	10
Glucose		20		
Cs-BAPTA	20	10	10	20
Cs Glutamat	120		140	120
pH	7.2	7.2	7.2	7.2
mOsm	350	350	350	300

2.6.2 Imaging-Lösungen

Tabelle 14: **Zusammensetzung der verwendeten Imaging-Lösungen** sortiert nach Versuch (Stoffangaben mM)

Bezeichnung	0 mM Ca	0,5 mM Ca	1,5 mM Ca	2 mM Ca
MgCl	3	2,5	1,5	1
CaCl ₂	0	0,5	1,5	2

alle Lösungen enthielten zusätzlich:

155 mM NaCl

4,5 mM KCl

5 mM HEPES

10 mM Glucose

die Osmolarität wurde bei allen Lösungen auf ~320 mosm eingestellt.

2.6.3 Sonstige verwendete Lösungen

2XYTA Medium, pH 7

1,6% Trypton
1% Select Yeast Extract
0,5% NaCl
Antibiotikum

Antibiotika mit Endkonzentration

100 µg/ml Ampicillin (Stock: 50 mg/ml in H₂O)
60 µg/ml Kanamycin (Stock: 50 mg/ml in H₂O)

Bakterienlagermedium

50,7% K₂HPO₄
0,3% KH₂HPO₄
0,05% Na₃Citrat
0,01% MgSO₄
50% Glycerin

Blottingpuffer, pH8.3

20% Methanol
1% SDS
250 mM Tris-HCl
1,92 M Glycin

Crosslinking-Puffer (Northernblot)

234 µl Methylimidazol
0,75 g EDC Hydrochlorid
auf 24 ml auffüllen

HEPES-Puffer

10 mM HEPES
150 mM NaCl

Hybridisierungspuffer (Northernblot)

7,5 ml SSC
0,6 mM Na₂HPO₄
10,5 ml Denhards Lösung 50x
eine Prise Blockreagenz

Lämmli-puffer 2x

8% SDS
120 mM Tris pH 6,8
0,1% Bromphenolblau
20% Glycerin
0,1% Beta-Mercaptoethanol

Lämmli-puffer 5x

125 mM Tris pH 6,8
2,5 % SDS
0,1% Bromphenolblau
60% Glycerin
25% Beta-Mercaptoethanol

LB-Agarplatten

LB-Medium
1,5% Agar
Antibiotikum

LB-Medium, pH7,5

1% Select Pepton oder Trypton
1% Select Pepton oder NaCl
0,5% Select Yeast Extract
Antibiotikum

RIPA-Lyse-puffer

PBS, pH eingestellt auf 7,4
10 mM Tris pH 7.4
1% Triton X-100
0,5 % NP40
150 mM NaCl

Primärantikörperlösung

Antikörper in entsprechender Verdünnung
1 % BSA
0,02 % Natriumazid

Sekundärantikörperlösung

Antikörper (in entsprechender Verdünnung)
5% Magermilch in TBST

SDS-Elektrophorese-puffer, 10x, pH8.3

250 mM Tris-HCl
1,92 M Glycin
0,1% Bromphenolblau
1% SDS

SSC-Puffer

3 M NaCl

0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat

TBE, 10x, pH8.3

89 mM Tris Base

89 mM Borsäure

10 mM EDTA

TBS, 10x, pH7.5

5 mM Tris-HCl

1,5 mM NaCl

TBST

0,1% Tween

10% TBS, 10x

Trenngelpuffer

1,6 M Tris-HCl

0,4% SDS

2.7 Lektine

Tabelle 15: **Verwendete Lektine** unter Angabe der entsprechenden Abkürzung

Lektine	Abkürzung
Sambucus Nigra Agglutinin	SNA
Sambucus Nigra Agglutinin	SNA-Beads
Maackia Amurensis Hämagglutinin	MAH
Phytohämagglutinin	PHA-P

Tabelle 16: **Verwendete Lektine (Abkürzung) unter Angabe von Konjugation, Hersteller und Bestellnummer**

Lektine	Konjugation	Hersteller	Bestellnummer
SNA	Biotin	Vector Labs	B-1305
SNA-Beads	Agarosebeads	Vector Labs	AL-1303
MAH	Biotin	Vector Labs	B-1265
PHA-P	Biotin	Sigma	L8753

2.8 Modifizierende Enzyme

Tabelle 17: **Verwendete modifizierende Enzyme** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Modifizierende Enzyme	Hersteller	Bestellnummer
Antarctic Phosphatase	NEB	M0289S
Phusion Polymerase	Finnzymes	F-530S
T4 DNA-Ligase	Finnzymes	M0289S
Neuraminidase (Sialidase)	Roche	11585886001
2,3-Neuraminidase	NEB	P0728S
PNGase F	NEB	P0704S
SuperScript II RT	Life Technologies	18064
T7 Polymerase	NEB	M0251S
Klenow Fragment	Thermo Scientific	EP0051
DNAse I	NEB	M0303S

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs bezogen.

2.9 Oligonukleotide

2.9.1 miRNA-mimics

Tabelle 18: **Verwendete miRNA-mimics** unter Angabe der entsprechenden miRNA, Bezeichnung und Hersteller

miRNA	Bezeichnung	Hersteller
hsa-miR-449a	MIM0397 miRNA Mimic	LightSwitch
hsa-miR-661a	MIM0661 miRNA Mimic	LightSwitch
non targeting	MIM9001 miRNA Mimic	LightSwitch

2.9.2 qRT-PCR-Primer

Tabelle 19: **Verwendete Oligonukleotide (Primer) für qRT-PCR** unter Angabe von Ziel-mRNA, Forward- und Reverse-Primer

Ziel-mRNA	Forward-Primer	Reverse-Primer
Orai1	5' atgagcctcaacgagcact 3'	5' gtgggtagtcgtggtcag 3'
Siglec 6	5' ctgcctcaagtagggtctgc 3'	5' tgatgctagctcccagact 3'
Siglec 7	5' cataggcataaggaagcagc 3'	5' gaggtcccccttatgaaag 3'
Siglec 8	5' acaagtgcactggcagcag 3'	5' ttgccatctttccaggattc 3'
Siglec 10	5' acagtctggaaaaccttg 3'	5' ctctcttcgtgctccactt 3'
Stim1	5' cagagtctgcatgacctca 3'	5' gcttctgcttagcaaggtt 3'
ST3GAl1	5' ccacacctacatcccggttc 3'	5' aggatgccggtagatgggta 3'
ST3GAl3	5' tctagctcaccacaggagaa 3'	5' atgcagtcaaggccaaaaac 3'

Tabelle 19: **Verwendete Oligonukleotide (*Primer*) für qRT-PCR** unter Angabe von Ziel-mRNA, Forward- und Reverse-*Primer*

Ziel-mRNA	Forward- <i>Primer</i>	Reverse- <i>Primer</i>
ST3Gal4	5' tttctggaacagcctcccc 3'	5' gtgcaccaagtcacagaggt 3'
ST3Gal6	5' tttgcctctctgtgaggtt 3'	5' cctccattaccaaccaccac 3'
ST6Gal1	5' cctctgggatgcttgggtatc 3'	5' gtgcaggcactatcgaagaa 3'
TBP	5' cggagagttctgggattgt 3'	5' gggtcgtggctctcttattc 3'

2.9.3 PCR-Primer

Tabelle 20: **Verwendete Oligonukleotide (*Primer*) für PCR** unter Angabe der internen BAN-Nummer, *Primer*-Sequenz und Beschreibung

BAN	<i>Primer</i> -Sequenz 5'-3'	Beschreibung
738	cgcaagcttgactctaggtctcagtcaac	miR-4687 FW
739	ggccctcgaggcgagtggagcagcacc	miR-4687REV
746	cccgatccgtatgctgtgattcactgtgtct	miR-34c FW
747	cgcagatctaacaaaacccacatacataca	miR-34c REV
748	cccgaattcttctgccactatgtttcatgtt	miR-449a FW
749	cgcagatcttttcttaccattataaaactgtgc	miR-449a REV
751	ggggagctcgggtcccaagctctc	Orai3'UTR kurz REV
750	ggggagctcctgtgaaacacgatttattatata	Orai3'UTR lang REV
775	ggggactagtggaaactagaggaaactgaatcg	Orai3 3'UTR FW
774	tggcagtgtattgttagctggctctgtctc	Sonde miR-449a
773	tggcagtgtcttagctgggtgtctgtctc	Sonde miR-34c
781	tggctgttgagggggagccctgtctc	Sonde miR-4687 3p
782	cagccctctcccgacccaaacctgtctc	Sonde miR-4687 5p
990	ggctgtgtgagactggtgttagccagctgatcaat	Bindestellenmutation-
	ctaagcgctgatccctccgggtctgtaagaggccg	34c/449a in O3 3'UTR
991	cggcctcttacagaccccgaggagatcagcgtta	Bindestellenmutation-
	gattgatcagctggctaacaccagtctcacacagcc	34c/449a in O3 3'UTR
1023	ggcgaattcagcgtgccacca	
1023	tggaagacgcaaaaacataaag	F.fly - ERI + Kozak
1017	ccagaggaattcattatcagtgaat	F.fly - ERI Rev
1018	gggttttagcgttcttccactctttcatcgctc	Orai3 Prom. FW
1019	gggaaaagcgctggcaccaggcggtcactac	Orai3 Prom. REV
1070	ccctcagcgtagcacgtaat	Orai1 Prom. FW
1071	aggctcatcacctcggagta	Orai1 Prom. REV
1021	tcagctcttctgccaagg	Non Prom. FW
1022	gaaggaggaaactggaagggc	Non Promotor REV 3'
	taatacgactcactataggg	T7-Prom. <i>Primer</i>

2.9.4 siRNA

Tabelle 21: **Verwendete siRNA** unter Angabe von Zielgen, Produktnummer, Zielsequenz und Hersteller

Zielgen	Produktnr.	Zielsequenz	Hersteller
ST6GAL1	SI00718172	TTGCTTGAAGTCTGCATCTAA	Qiagen
SIGLEC6-3	SI00718865	TAGGGCTGCCACAGCAATGTA	Qiagen
SIGLEC6-4	SI00718872	CACAAGTGAGGAATTGTCCAA	Qiagen
SIGLEC6-5	SI03052770	CAAATGGATGAAATACGGTTA	Qiagen
SIGLEC6-6	SI03057439	CACCAGTTCCAGACAGGCATA	Qiagen
SIGLEC8-5	SI02640631	CCGCACCCAGCTTGCATTGAA	Qiagen
S1GLEC8-7	SI002640645	CCCAGCTTGCATTGAATATTT	Qiagen
SIGLEC8-9	SI03072356	CAGGTGTGACCACGACCAGTA	Qiagen
SIGLEC8-13	SI04385927	ATGGAGGGAGACAGACAATAT	Qiagen
non sil.-contr.	1027310		Qiagen
non sil.-contr.	1894379		Microsynth

Tabelle 22: **siRNA-Sonderanfertigungen** unter Angabe von Zielgen, Sequenz und Hersteller

Zielgen	Sequenz	Hersteller
Orail (3'UTR)	5'-55C UGU CCU CUA AGA GAA 677 88-3'	Microsynth
	5'-5UA UUC UCU UAG AGG ACA G66-3'	
non sil. -contr.	5'-55A GGU AGU GUA AUC GC6 77G 88-3'	Microsynth
	5' 5AA GGC GAU UAC ACU ACC U66-3'	

5=2OmeA, 6=DU, 7=dA, 8=2OMeT

Alle siRNAs außer non sil.-contr. (1027310 Qiagen: 20 µM) wurden in einer Konzentration von 40 µM angesetzt

2.10 Reagenzien-Systeme

Tabelle 23: **Verwendete Reagenzien-Systeme** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Reagenzien System	Hersteller	Bestellnr.
BCA Protein Assay Kit	Thermo scientific	23225
Clarity Western ECL	Biorad	1705060
Phusion High Fidelity PCR Kit	NEB	F553S
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen	27106
QIAquick Gel extraction Kit	Qiagen	28706
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12662
Qproteome Sialic Glycoprotein Kit	Qiagen	37561
Dual Glow Luciferase Assay System	Promega	E2920
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega	E1910
Dynalbeads Untouched Human CD4	Dynal Biotech	11346D

Tabelle 23: **Verwendete Reagenzien-Systeme** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Reagenzien System	Hersteller	Bestellnr.
Dynalbeads Untouched Human CD8	Dynal Biotech	11348D
QuantiTect SYBRgreen kit	Qiagen	204145
T4 Ligase Kit	Life Technologies	EL0012
Sequagel Urea Gel System	National Diagnostics	4046992121
pJet PCR Cloning Kit	Thermo Scientific	K1231

2.11 Verwendete Vektoren und klonierte Konstrukte

2.11.1 Verwendete Plasmide

Tabelle 24: **Verwendete Plasmide** unter Angabe von Hersteller/Bereitstellung

Plasmid	Hersteller/Bereitstellung durch
pCAGGS	J.Miyazaki
pGK-Puro-MO70M_GFP	Addgene
pSG5	F. Gräßer (Institut für Virologie, UdS)
pMIR_TK-RNL	F. Gräßer (Institut für Virologie, UdS)

pMIR_TK-RNL

Der eukaryotische Vektor pMIR_TK-RNL wurde zur Analyse von miRNA Effekten auf die mRNA der Ziel-Gene verwendet. Ausgehend vom Originalvektor pMIR-REPORT™(Ambion) wurde durch die Arbeitsgruppe Meister (Max-Planck-Institut, Martinsried) in den Vektor die Sequenz der Renilla-Luciferase unter der Kontrolle eines TK-Promotors eingefügt.

Die Klonierung der entsprechenden 3'UTRs erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mittels der angegebenen Endonuklease-Seiten hinter die Sequenz der Firefly-Luciferase. Für die Amplifikation der 3'UTRs aus genomischer DNA wurden die angegebenen Oligonukleotide verwendet und die DNA nach Endonuklease-Verdau über die angegebenen Schnittstellen mit dem Vektor ligiert (s. Abb. 10). Die Mutation der miRNA-Bindestelle erfolgte mittels Overlap-Extension-PCR.

pSG5

(mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe Gräßer, Universität des Saarlandes)

Die Expression im eukaryotische Expressionsvektor pSG5 erfolgt ebenfalls unter der Kontrolle eines SV40 Promotors. Der SV40 *origin of replication* ermöglicht über episomale Replikation eine besonders hohe Expression in Zelllinien wie HEK293T-Zellen, die das SV40 *large T-antigen* exprimieren. Die Klonierung der pre-miRNA-Sequenzen von hsa-miR34c, hsa-miR449a und hsa-miR4387 erfolgte im Rahmen dieser Arbeit aus genomischer DNA mittels der angegebenen Endonuklease-Seiten. Für die Amplifikation der 3'UTRs aus DNA wurden die angegebenen Oligonukleotide verwendet und die DNA nach Endonuklease-Verdau über die angegebenen Schnittstellen mit dem Vektor ligiert (s. Abb. 11).

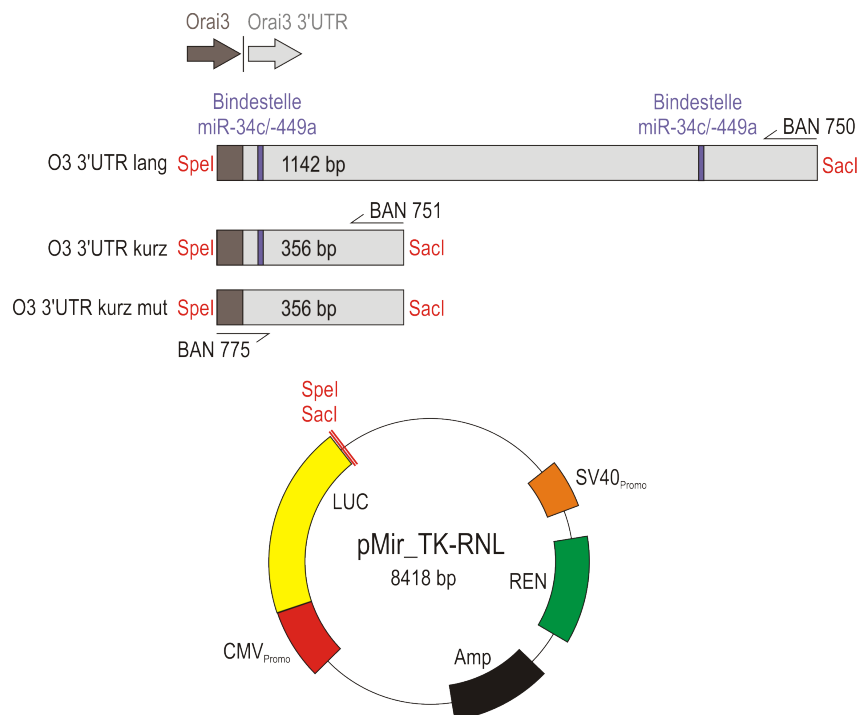


Abbildung 10: **Schematische Darstellung von pMIR_TK-RNL und den einklonierten Konstrukten.** Die entsprechenden 3'UTR-Fragmente wurden mit Hilfe der angegebenen *Primer* aus genomischer DNA amplifiziert und über die angegebenen Schnittstellen SpeI/SacI hinter die Sequenz der Firefly-Luciferase in den Vektor pMIR_TK-RNL kloniert.

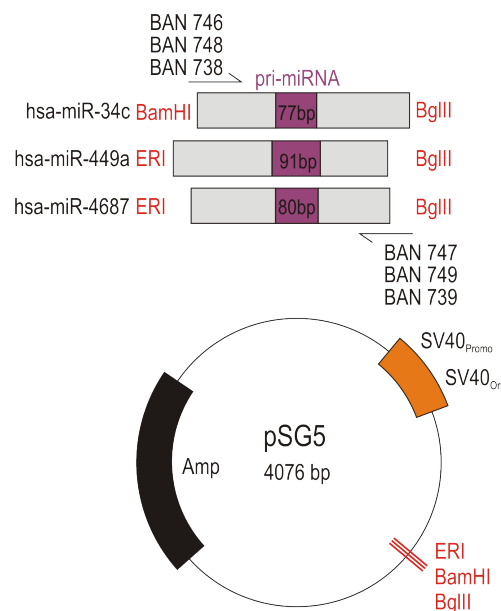


Abbildung 11: **Schematische Darstellung von pSG5 und den einklonierten Konstrukten.** Die entsprechenden DNA-Fragmente mit der Sequenz der Primär-miRNA (pri-miRNA) wurden mit Hilfe der angegebenen *Primer* aus genomischer DNA amplifiziert und über die angegebenen Schnittstellen BamHI/EcoRI und BglII in den Vektor pSG5 kloniert.

pMIR_TK-RNL ohne CMV

Zur Klonierung der Promotorkonstrukte wurde der CMV-Promotor aus dem dualen Reporter-Vektor pMIR_TK-RNL entfernt und durch eine Kozaksequenz vor dem Start-Codon der Firefly-Luciferase sowie eine AfeI-Restriktionsschnittstelle ersetzt. Für die Amplifikation der Promotorregionen aus genomischer DNA wurden die angegebenen Oligonukleotide verwendet und die DNA nach Endonuklease-Verdau über die AfeI-Restriktionsschnittstelle mit dem Vektor ligiert (Abb. 12).

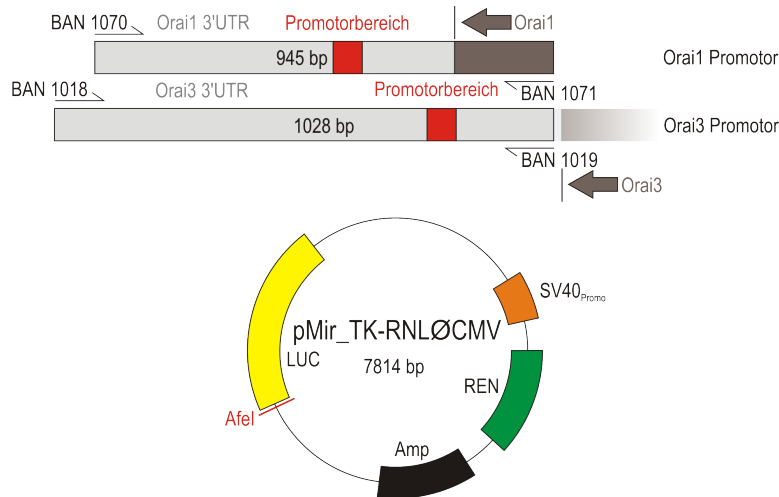


Abbildung 12: **Schematische Darstellung von pMIR_TK-RNLØCMV und den einklonierten Konstrukten.** Die entsprechenden Promotorbereiche aus der 5'UTR von Orai1 und Orai3 wurden mit Hilfe der angegebenen *Primer* aus cDNA naiver Lymphozyten amplifiziert und über die angegebene Schnittstelle AfeI vor die Sequenz der Firefly-Luciferase in den Vektor pMIR_TK-RNLØCMV kloniert.

2.11.2 Hergestellte und verwendete Konstrukte

Hergestellte Konstrukte

Tabelle 25: **Für diese Arbeit hergestellte Konstrukte** unter Angabe der verwendeten Klonierungs-*Primer*, dem ligierten Vektor und der zur Ligation verwendeten Schnittstellen

Bezeichnung	<i>Primer</i>	Vektor	Schnittstellen
hsa-miR34c	BAN 746/747	pSG5	BamHI/BglII
hsa-miR449a	BAN 748/749	pSG5	BglII/ERI
hsa-miR4687	BAN 738/739	pSG5	BglII/ERI
Orai3-3'UTR kurz	BAN 751/775	pMir	SpeI/SacI
Orai3-3'UTR lang	BAN 750/775	pMir	SpeI/SacI
Orai3-3'UTR kurz mut	BAN 990/991	pMir	SpeI/SacI
pMirØCMV	BAN 1017/1023	pMir	EcoRI
Orai1Promo	BAN 1070/1071	pMirCMV	AfeI
Orai3Promo	BAN 1018/1019	pMirCMV	AfeI

Sonstige verwendete Konstrukte

pCAGGS_Stim1_IRES_GFP
pCAGGS_IRES_GFP
HA-Orai1WT-pGK-Puro-MO700cite_GFP
HA-Orai1N223A-pGK-Puro-MO700cite GFP
pCAGGS_Orai1_IRES_GFP
pCAGGS_Orai1N223A_IRES_GFP
pCAGGS_Stim1_IRES_RFP
pSG5_hsa-miR148a
pSG5_hsa-miR375

Alle Orai1/Stim1 Konstrukte wurden von Dr. Dalia Al Ansary und Dr. Tatiana Kilch kloniert und zur Verfügung gestellt. Sie enthalten Orai1 und Stim1 als Vollängenkonstrukte inklusive vorgeschalteter Kozak-Sequenz (GCCACC). Die Klonierung und Bereitstellung von pSG5_hsa-miR-148a und -375 erfolgte durch Dr. Martin Hart (AG Gräßer, Virologie, UdS).

2.12 Verbrauchsmaterial

Tabelle 26: **Verwendetes Verbrauchsmaterial** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Bestellnummer
6X-Loading Dye	Thermo Scientific	R0619
a-HA-konjugierte Agarose	Life Technologies	26181
Hybond N	GE Healthcare	RPN 203 N
Immobion-P PVDF Membran	Merck	IPVH 00010
Streptavidin Magnetic Beads	GE Healthcare Life Sci.	28-9857-38
Human T-Activator CD3/CD28 Beads	Thermo Scientific	11132D

2.13 Zellkultur

2.13.1 Transfektionsreagenzien

Tabelle 27: **Verwendete Transfektionsreagenzien** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Transfektionsreagenz	Hersteller	Bestellnummer
FuGene HD	Promega	E2311
Cell Line Nucleofector Kit V	Lonza	VCA-1003
T-Cell Nucleofector Kit	Lonza	VVPA-1002
SF Cell Line 4 D NF X Kit L	Lonza	V4XC-2024
Lipofectamine LTX PLUS	Life Technologies	15338-030
INTERFERin	Polyplus	409-10

2.13.2 Zellkulturmedien

Tabelle 28: **Verwendete Zellkulturmedien** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Zellkulturmedium	Hersteller	Bestellnummer
Optimem Glutamax	Invitrogen	51985
RPML-1640	Life Technologies	21875-091
alpha-MEM	Life Technologies	11900-073
MCDB 153	Merck Millipore	F8105
Leibovitz Medium (L15)	Biochrome AG	F1315
DMEM	Life Technologies	41966-052
IMDM	Life Technologies	21980-032
PBS	Life Technologies	14190-169
AIMV	Life Technologies	12055-083
MEM	Life Technologies	31095-029

2.13.3 Zellkulturzusätze

Tabelle 29: **Verwendete Zellkulturzusätze** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Zellkulturzusatz	Hersteller	Bestellnummer
Swainsonin	TRC	S885000
Tunicamycin	Sigma	T7765
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen	15140
Ampicillin	Sigma	A9393
FCS	Invitrogen	10270
Kanamycin	Sigma	K0254
Laktose	Applichem	A0880
Natriumchlorat	Sigma	403016
Puromycin	Calbiochem	540411
Natriumhydrogencarbonat	Merck	1.06329.0500
Insulin	Sigma	19278
Trypsin	Life Technologies	25300-062
Accutase	PAA	L11-007
BCS	Hyclone	SH30072.03
α -Thioglycerol	Sigma	M6145

2.13.4 Zelllinien

Tabelle 30: **Verwendete Zelllinien** unter Angabe der Bezugsquelle

Zelllinien	Zellbank	zur Verfügung gestellt von
HEK293	ATCC CRL-1573	F. Grässer, Universität des Saarlandes
HEK293T		
SKMEL5	ATTC HTB-70	M. Herlyn, Wistar Institut Philadelphia
WM3734		
HMC1.2	ATCC TIB-152	J.H. Butterfield, Mayo Clinic Minnesota
Jurkat E6.1		P. Stanley, A. Einstein College New York
CHO _{SF/Lec}		
Jurkat _{pCasper3-GR}		C. Backes, Universität des Saarlandes

Kapitel 3

Methoden

3.1 Rekombinante DNA-Technologien

3.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (=Polymerase Chain Reaction = PCR) ist eine molekularbiologische Technik zur selektiven Vervielfältigung von DNA-Doppelstrangabschnitten. Dabei reichen wenige Kopien einer DNA, um sie um das Tausend- bis Millionenfache zu vermehren.

Die Methode basiert auf zyklischen Temperaturveränderungen (Thermocycling), wobei das Reaktionsgemisch abwechselnd erhitzt und gekühlt wird.

Schlüsselkomponenten der PCR sind kurze Oligonukleotide (*Primer*), Desoxynukleotide und eine hitzebeständige Polymerase. Ein *Primer* ist dabei komplementär zu einem Strang am Anfang des zu amplifizierenden Abschnittes, der andere *Primer* ist komplementär zum Gegenstrang am Ende des zu amplifizierenden Abschnittes. Der zu amplifizierende Abschnitt wird dadurch eingegrenzt. Vom 3' Ende beider *Primer* aus, kann die Polymerase komplementär zum vorliegenden DNA-Strang nun Desoxynukleotide zu einem neuen DNA-Strang verknüpfen.

Um einen einzelsträngigen DNA-Strang für die Polymerase zu erhalten, muss die DNA zunächst denaturiert und somit einzelsträngig werden: der erste Schritt des Thermocycling (=Denaturierung). Dabei wird die DNA auf 94-98 °C erhitzt, wobei die Temperatur des Denaturierungsschrittes abhängig von der verwendeten Polymerase; die Dauer von der Länge der zu denaturierenden DNA ist.

Die Temperatur wird nun auf einen Wert gesenkt, der eine Anlagerung der kurzen *Primer* ermöglicht, jedoch noch hoch genug ist, dass sich die DNA als Ganzes, nicht wieder mit ihrem komplementären Strang zusammenlagert. Diese Temperatur ist abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung der *Primer* und lässt sich zum Beispiel mit Hilfe der Wallace-Regel berechnen:

$$T_m = (G + C) \times 4 + (A + T) \times 2$$

Man spricht bei diesem Schritt vom Annealing.

Für den dritten Schritt, die Elongation, wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase erhöht, welche meist bei 72 °C liegt. Die Polymerase kann entsprechend komplementär dem vorliegenden DNA-Strang in 5' Richtung Desoxynukleotide an den *Primer* knüpfen und so einen neuen DNA-Strang synthetisieren.

Die Dauer der Elongation ist abhängig von der verwendeten Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden DNA Abschnittes. Während die, wegen ihrer exzellenten Korrekturlesefunktion für präparative Anwendungen, verwendete Phu-Polymerase mit 15-30 Sekunden pro Kilobase auskommt, braucht die weniger exakte, aber preisgünstigere Taq Polymerase, die deshalb eher für die qualitative Analyse eingesetzt wird, bis zu einer Minute für Tausend Basenpaare.

Nach der Elongation liegt jeder DNA-Strang wieder als Doppelstrang vor und mit einer erneuten Denaturierung startet der nächste Zyklus des Themocycling.

Denaturierung, Annealing und Amplifikation werden in dieser Reihenfolge 20-30mal wiederholt. Die genaue Anzahl der Wiederholungen ist abhängig von der Qualität und Menge der vorliegenden DNA sowie der gewünschten Menge an PCR-Produkt. Präparative PCR-Reaktionen wurden nach dem Schema in Tabelle 31 angesetzt:

Tabelle 31: **Pipettierschema der durchgeführten PCR-Reaktionen**

20-60 ng	DNA-Matrize DNA
2,5 µl	<i>Primer</i> 1 (10 pmol/ µl)
2,5 µl	<i>Primer</i> 2 (10 pmol/ µl)
10 µl	5x High fidelity Puffer
1 µl	dNTPs (je 10 mM: dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
32,5 µl	H ₂ O
0,5 µl	Phusion Polymerase
<hr/>	
50 µl	Gesamtvolumen

Eine Übersicht der Temperaturzyklen für die durchgeführten PCR-Reaktionen ist in Tabelle 32 dargestellt.

Tabelle 32: **Temperatur-Zyklus-Konditionen für PCR-Reaktionen**

Zeit	Temperatur	
98°C	3 min	
98°C	30 s	
T _m (58-64°C)	15-30 s	x30-35
72°C	15-90 s	
72°C	10 min	
4°C	∞	

Bei der Amplifikation besonders GC-reicher Sequenzen (wie z.Bsp. Orai1) wurde dem PCR-Ansatz statt 5x HF Puffer ein spezieller GC-Puffer zugesetzt. Außerdem wurde der

Ansatz zusätzlich mit 1,5 µl DMSO ergänzt, welches die Sekundärstrukturbildung reduziert, und die H₂O-Menge entsprechend angepasst.

3.1.2 Overlap-Extension-PCR

Zur Mutation mehrerer Basen eines Inserts in einem Vektor wurde die Overlap-Extension PCR eingesetzt.

Dazu wurde je eine Hälfte des zu mutierenden Inserts mit dem endständigen, ursprünglichen Klonierungs-*Primer* und einem Oligonukleotid amplifiziert, das die zu ändernden Basen in der gewünschten Sequenz enthielt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen dabei einer präparativen PCR.

Die beiden PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und isoliert. In einem zweiten Schritt wurde eine zweite PCR mit beiden ursprünglichen Klonierungs-*Primern* durchgeführt, wobei jeweils 1 µl der beiden isolierten PCR-Produkte aus Teil 1 als Template eingesetzt wurden. Das Produkt konnte dann wieder in den entsprechenden Vektor kloniert werden.

3.1.3 Kolonien-PCR

Bei der Kolonien-PCR macht man sich die Methode der PCR zum Nachweis bestimmter DNA Abschnitte in einem Bakterienklon zu Nutze; häufig nach Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor und anschließender Transformation.

Kolonien-PCR-Reaktionen wurden nach dem Schema in Tabelle 33 angesetzt. Eine Übersicht der Temperaturzyklen für die durchgeführten Kolonie-PCR-Reaktionen ist in Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 33: **Pipettierschema der durchgeführten Kolonien-PCR-Reaktionen**

	Halbe Kolonie als DNA-Matrize
1,5 µl	<i>Primer</i> 1 (10 pmol/µl)
1,5 µl	<i>Primer</i> 2 (10 pmol/µl)
3 µl	Dream Green Puffer (Fermentas)
0,6 µl	dNTPs (je 10 mM: dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
0,6 µl	Taq Polymerase
22,8 µl	H ₂ O
<hr/>	
30 µl	Gesamtvolumen

Wählt man den Vorwärts-*Primer* komplementär zu einem Abschnitt des Vektors kurz vor der Insertionsstelle und den Rückwärts-*Primer* komplementär zur Anfangssequenz des Inserts, so kann man mit einer Reaktion nicht nur testen, ob das Insert in den Vektor integriert wurde, sondern gleichzeitig auch noch die korrekte Insertionsrichtung

Tabelle 34: **Temperatur-Zyklus-Konditionen für Kolonien-PCR-Reaktionen**

Zeit	Temperatur	
94°C	5 min	
94°C	30 s	x30-35
T _m (58-64°C)	15-30 s	
72°C	15-90 s	
72°C	7 min	
4°C	∞	

überprüfen, da nur bei korrekter Insertion ein Produkt zu erwarten ist. Statt über die Insertionsschnittstelle am 5' Ende des Inserts können die *Primer* natürlich auch passend für eine Amplifikation über die Insertionsschnittstelle am 3' Ende des Inserts gelegt werden.

Der besondere Vorteil der Kolonien-PCR liegt darin, dass die DNA-Matrize nicht aus den Bakterienklonen isoliert werden muss. Als Matrize wird stattdessen eine halbe Kolonie eingesetzt. Die Bakterienzellen werden bei der Denaturierungstemperatur von 94-98 °C aufgeschlossen, so dass die Plasmid-DNA dann frei zugänglich ist. Da das PCR-Produkt hierbei nur der qualitativen Analyse dient, wurde für Kolonien-PCR-Reaktionen die Taq Polymerase eingesetzt.

3.1.4 Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) können eingesetzt werden, um die DNA an bestimmten Stellen aufzutrennen.

Sie erkennen spezifische, meist palindromische Sequenzen von 4-6 Nukleotiden und spalten dort die Phosphodiesterbrücken der DNA. Dabei kann die Spaltung gerade erfolgen, woraus stumpf endende Fragmente resultieren (*blunt ends*). Andere Restriktionsenzyme spalten den Doppelstrang versetzt, so dass kurze Einzelstrang-Enden mit spezifischer Sequenz entstehen (*sticky ends*).

Das Pipettierschema der durchgeführten Restriktionsverdaue ist in Tabelle 35 dargestellt.

Tabelle 35: **Pipettierschema der durchgeführten Restriktionsverdaue**

2 µl	DNA
1 µl	Restriktionsenzym
3 µl	des zugehörigen Puffers (10x)
3 µl	BSA
ad 30 µl	mit H ₂ O
37°C/2 h	

Beim Einsatz von Restriktionsenzymen zur Analyse wurde weniger DNA eingesetzt. Außerdem wurde die Enzymmenge auf 0,5 µl und die Inkubationszeit auf 1 h verkürzt.

3.1.5 Dephosphorylierung von DNA mit Phosphatase

Wird ein Vektor nur mit einem Restriktionsenzym oder blunt geschnitten, so hat dieser bei der Ligation eine sehr hohe Tendenz kein Insert aufzunehmen und stattdessen zu religieren.

Die Phosphatase entfernt die 5' Phosphate der endständigen Didesoxynukleotide des zugesetzten Vektors, so dass dieser theoretisch nur noch mit einem phosphorylierten Insert ligieren kann. Praktisch wird durch eine Phosphatasebehandlung die Religationsfrequenz eines Vektors zumindest deutlich reduziert.

Das Pipettierschema für Dephosphorylierungen mit alkalischer Phosphatase ist in Tabelle 36 dargestellt.

Tabelle 36: Pipettierschema für Dephosphorylierungen mit alkalischer Phosphatase

30 µl	der Restriktionsenzym-behandelten DNA
4 µl	Antarctic Phosphatase Puffer
2 µl	Antarctic Phosphatase
4 µl	H ₂ O

Nach einer Inkubation von 60 min bei 37 °C wurde die Phosphatase durch 5minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 65 °C deaktiviert.

Zur Ligation mit einem dephosphorylierten Vektor, müssen die 5'Phosphate des Inserts phosphoryliert sein. Dazu wurden bei der Amplifikation der Inserts entweder phosphorylierte *Primer* verwendet, oder über *Primer* eine vollständige Schnittstelle angefügt und nach NaCl-Ethanol-Fällung mit dem entsprechenden Restriktionsenzym nachgeschnitten.

In diesem Fall sollten je nach verwendetem Restriktionsenzym bis zu 6 zusätzliche Nukleotide vor der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym vorhanden sein, um einen optimalen Restriktionsverdau zu gewährleisten.

3.1.6 DNA-Analyse und gelelektrophoretische Auftrennung

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung können unterschiedlich große Fragmente von Nukleinsäuren durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an eine Gelmatrix in dieser aufgetrennt werden.

Dabei erfolgt die Auftrennung der DNA nach Größe und der Vergleich mit einem Größenstandard erlaubt später den Rückschluss von der Position im Gel auf die Größe des entsprechenden DNA-Fragmentes. Die Elektrophorese wird in Pufferlösungen durchgeführt, da die Ladung von DNA und damit ihr Laufverhalten pH abhängig ist.

Agarosegele

Für das Auftrennen von DNA zu analytischen Zwecken wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 0,6 - 2 Prozent verwendet. Bei Agarose handelt es sich um ein lineares

Polymer mit den Bausteinen D-Galactose und 3,6-anhydro-L-galactopyranose. Die langen, ungeladenen Ketten ohne Quervernetzungen bilden ein Polymer mit großen Poren, das für die Auftrennung von DNA gut geeignet ist.

Dabei bewegen sich kürzere DNA Fragmente schneller in Richtung Anode als längere Fragmente. Die beste Auflösung erreicht man für kürzere Fragmente (0,2-1 kb) mit Gelen hoher Konzentration, für längere Fragmente sind Gele mit niedriger Konzentration besser geeignet.

Zum Lösen des Agarosepulvers wurde dieses in TBE-Puffer aufgekocht. Um die DNA Banden im Gel zu visualisieren, wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 5-10 µl/100 ml Gel eingesetzt, das dem Gel kurz vor dem Gießen zugegeben wurde.

Ethidiumbromid ist eine DNA interkalierende Substanz, deren Fluoreszenz nach dem Interkalieren unter UV-Licht zunimmt und so DNA-Banden im Ethidiumbromid-behandelten Gel sichtbar macht.

Als Laufpuffer wurde in die Kammern ebenfalls TBE-Puffer eingefüllt. Die Laufdauer der Gele betrug etwa 40-60 min bei einer Spannung zwischen 80 und 140 mV.

GTQ-Agarosegele

Für präparative Auftrennungen wurden 0,6-2,0 %ige Gele aus GTQ-Agarose verwendet: eine besonders reine sowie RNAase und DNAase freie Agarose mit einer niedrigeren Schmelztemperatur, die es erlaubt durch Aufschmelzen der Agarose DNA aus dem Gel zu reisolieren, ohne die DNA-Doppelstränge dabei zu trennen.

Gelextraktion

Um DNA-Fragmente bestimmter Größe zu isolieren, wurde der Reaktionsansatz auf einem GTQ-Gel aufgetrennt und die entsprechende Bande anschließend unter UV-Licht ausgeschnitten.

Aus dem Gel wurde die DNA dann mit dem QIAquick Gel Extraction Kit entsprechend des Herstellerprotokolls isoliert.

Bestimmung der DNA-Konzentration

Delokalisierte p-Elektronen in den Purin- und Pyrimidinringen der DNA-Basen absorbieren Licht der Wellenlänge 260 nm.

Bestimmt man mittels eines Photometers die Extinktion einer DNA-Lösung bei 260 nm, so kann daraus mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes die DNA-Konzentration berechnet werden.

$$\text{Lambert - Beer - Gesetz : } E_{\lambda} = -\lg \left(\frac{I_1}{I_0} = \epsilon_{\lambda} * c * d \right)$$

E_λ : Extinktion
 I_1 : Intensität des transmittierten Lichtes
 I_0 : Intensität des einfallenden Lichtes
 ϵ_λ : dekadischer Extinktionskoeffizient
 c : Konzentration der absorbierenden Substanz
 d : Schichtdicke des durchstrahlten Körpers

Für die Konzentrationsbestimmung wurde meist eine Verdünnung von 1:40 eingesetzt.

Sequenzierung

Zur Ermittlung von DNA-Sequenzen wurden 1,2 µg der DNA mit 3 µl *Primer* (10 pMol/µl) in einem Gesamtvolumen von 15 µl (mit Wasser aufgefüllt) im Sequenzierlabor SEQLAB in Göttingen sequenziert.

3.1.7 Ligation

Um DNA-Fragmente zu verbinden, benötigt man ein Enzym, das in der Lage ist 5'Phosphatenden und 3'Hydroxyenden zweier DNA-Doppelstränge wieder zu verknüpfen. Enzyme, die solche Reaktion katalysieren, nennt man Ligasen.

Für ihre Reaktion brauchen Ligasen ATP, das der Reaktion (meist in Form des Puffers) zugesetzt werden muss. Ligationen wurden, falls nicht anders erwähnt, nach den Schema in Tabelle 37 angesetzt:

Tabelle 37: Pipettierschema für Ligationen

X µl	Insert
Y µl	Vector
1 µl	T4-Ligase Puffer
1 µl	T4-Ligase
ad 10 µl	mit H ₂ O

Die Ligation erfolgte für ca. 10-60 min bei 22 °C.

3.1.8 Expression und Isolation heterologer DNA-Konstrukte

Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Bakterien können chemisch für die Aufnahme fremder DNA kompetent gemacht werden. Dazu behandelt man sie in der Mitte der Log-Phase ihrer Wachstumskurve mit Kalzium- oder Magnesiumchlorid. Die verwendeten XL-1 Blue-Zellen wurden dazu ausgestrichen und am nächsten Tag ein Klon des Ausstrichs zum Animpfen einer Vorkultur verwendet, die 16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert wurde. 1 ml der Vorkultur wurde im Folgenden

zum Animpfen der 100 ml Hauptkultur eingesetzt, die nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,35 - 0,45 geerntet wurde (Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C für 15 min).

Die Resuspension der Zellpellets erfolgte je nach Größe in 5-10 ml TSS-Puffer, der das MgCl₂ für die Induktion der chemischen Kompetenz enthält. Um die Kompetenz zu erhalten, wurden die Zellen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zum Test der Kompetenz wurden die Zellen mit 2 µg eines Plasmides transformiert und je 100 µl einer 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnung ausplattiert. Zur Berechnung der Kompetenz/Transformationseffizienz (Anzahl an Kolonien pro µg transformierte DNA) wurde folgende Formel herangezogen:

$$Kompetenz = Koloniezahl \times Verdünnungsfaktor \times \frac{\text{ausplattiertes Volumen}}{\text{Gesamtvolumen}} \times \frac{1}{\mu\text{g Plasmid}}$$

Die Zellen wurden als ausreichend kompetent für Klonierungen betrachtet, sofern die Transformationseffizienz zwischen 10⁶ und 10⁷ Kolonien/µg DNA lag.

Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen

Die Transformation der Bakterienzellen mit DNA erfolgte über eine Hitzeschockbehandlung. Dazu wurden die bei -80 °C gelagerten Zellen 15 min auf Eis aufgetaut, der Ligationsansatz hinzupipettiert, vorsichtig gemischt und weitere 30 min auf Eis inkubiert.

Für den Hitzeschock wurden das Zell-DNA-Gemisch 90 s bei 42 °C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt, bevor 1 ml 2xy-Medium hinzu gegeben wurde. Zur Erholung wurden die Zellen im Anschluss etwa eine Stunde bei 37 °C geschüttelt.

Zum Ausplattieren wurden LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum für den verwendeten Vektor benutzt, um eine Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien zu erreichen. Ausplattiert wurden zunächst 100 µl des Transformationsansatzes. Der Rest wurde anschließend 3 min bei 5000 g zentrifugiert, das Pellet in 100 µl Restüberstand resuspendiert und auf einer zweiten Platte ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Plasmid-Präparationen (Mini- und Maxiprep)

Für kleinere DNA-Mengen (etwa 10 µg) wurden 5 ml LB-Medium mit einer Bakterien-Kolonie angeimpft, etwa 16 h inkubiert und aus 2 ml die DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert.

Für größere DNA-Mengen (etwa 1500 µg) wurden 200 ml LB-Kulturen mit 200 µl Vorkultur angeimpft und 16 h bei 37°C inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte dann mit dem HiSpeed Plasmid Maxi Kit von Qiagen.

Bei beiden Kits wird die Plasmid-DNA zunächst mittels alkalischer Lyse freigesetzt und anschließend neutralisiert. Im Isolationsprinzip unterscheiden sich die beiden Kits. Beim Spin Miniprep Kit bindet die DNA in einem stark salzhaltigen Puffer an eine Silicagel-Membran und kann nach dem Waschen mit einem schwach salzhaltigen Puffer eluiert

werden. Beim HiSpeed Plasmid Maxi Kit bindet die DNA in einem schwach salzhaltigen Puffer an eine Anionen-Austauscher-Membran und kann nach dem Waschen mit einem stark salzhaltigen Puffer eluiert und mittels Isopropanol gefällt und isoliert werden.

3.2 Arbeiten mit humanen Zellen

3.2.1 Zellkultur

Alle verwendeten Säugerzelllinien wurden in bei 37 °C, 5 % CO₂ und ~ 95 % Luftfeuchte kultiviert. Passage, Transfektion und das Splitten der Zellen wurden unter sterilen Bedingungen und Benutzung einer Steril-Bank mit laminarer Luftströmung (Biological safety cabinet, HERAsafe) durchgeführt.

Sofern nicht anders angegeben, wurde für die Passage adhärenter Zellen Trypsin (0,05 % Trypsin + 1x EDTA (Gibco)) verwendet. Geerntet wurden die Zellen durch Zentrifugation bei Raumtemperatur für 3 min bei 1000 rpm.

HEK293-Zellen

Die Kultivierung der HEK293-Zellen erfolgte in MEM-Medium, angereichert mit 100 units/ml Penicillin-G-Natrium, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % FCS (fetal calf serum).

HEK293T-Zellen

Die Kultivierung der HEK293T-Zellen erfolgte in DMEM-Medium, angereichert mit 100 units/ml Penicillin-G-Natrium, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % FCS.

Jurkat-T-, SKMEL5- und Raji-Zellen

Die Kultivierung von Jurkat-T-Zellen, SKMEL5 und Raji-Zellen erfolgte in RPMI1640-Medium angereichert mit 100 units/ml Penicillin-G-Natrium, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % FCS.

CHO_{WT/Lec}-Zellen

Die Kultivierung von CHO_{WT/Lec}-Zellen erfolgte in alpha-MEM-Medium angereichert mit 10 % FCS und NaHCO₃ (2,2 g/l).

WM3734-Zellen

Die Kultivierung von WM3734-Zellen erfolgte in einer 4:1 Mischung von MCDB 153-Basalmedium und Leibovitz-Medium angereichert mit 10 % FCS, 1,6 mM CaCl₂ und 2,4 mg/ml Insulin. Für die Passage wurde bei dieser Zelllinie Accutase verwendet.

HMC1.2-Zellen

Die Kultivierung von HMC1.2-Zellen erfolgte in IMCM-Medium angereichert mit 10 % BCS (bovines Kälberserum) und 1,2 mM α -thioglycerol.

Jurkat T-Zelllinien mit stabiler Integration von Orai1_{WT/N223A} bzw. pCasper3-GR

Die stabil Orai1_{WT/N223A} exprimierenden Jurkat-Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Transfektion von E6.1 Jurkat-T-Zellen mit HA-Orai1_{WT}-MO70 Δ citeGFP bzw. HA-Orai1_{N223A}-MO70 Δ citeGFP, Vereinzelung, Vermehrung und Selektion positiver Klone hergestellt.

Kultiviert wurden die Zelllinien im gleichen Medium wie die Jurkat-T-Zellen unter Zusatz von 2/8 μ g/ml Puromycin (1 mg/ml in H₂O) zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks. Bei Kultivierung der pCasper3-GR stabil exprimierenden Jurkat T-Zelllinie wurde der Selektionsdruck durch 0,8 mg/ml G418 im Medium aufrechterhalten.

Humane Lymphozyten

Für naive CD4⁺- und CD8⁺-Zellen wurden periphere mononukleäre Zellen (peripheral blood mononuclear cells = PBMCs) nach dem Auswaschen aus Leukozyten Reduktionskammern (TrimaAccelSystem) durch Ficoll Gradienten-Zentrifugation (Ficol-PaqueTMplus) isoliert und mit Hilfe des Dynal CD4⁺/CD8⁺ Negativ Isolation Kits nach Herstellerangaben isoliert, wobei als Puffer 1 0.5 % BSA statt EDTA verwendet wurde.

Die Aufreinigung und Isolation der verwendeten PBMCs wurde von Carmen Hässig durchgeführt. T-Zellen wurden in AIMV-Medium + 10 % FCS kultiviert. Zur Stimulation von T-Zellen wurden α -CD3/ α -CD28-gekoppelte *Beads* im Verhältnis 2:1 (*Beads*/Zellzahl) zugesetzt und für 7 Tage mit den Zellen inkubiert.

3.2.2 Hemmung der Glykosylierung in lebenden Zellen

Zur Hemmung der Glykosylierung in lebenden Zellen wurden Tunicamycin (3 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO)) 1:1000 oder Swainsonin (1 mg/ml in H₂O) 1:500 eingesetzt, wobei Kontrollzellen das entsprechende Lösemittel in den gleichen Mengen zugegeben wurde. Sofern nicht anders angegeben, wurden beide Substanzen dem Kulturmedium 24 h vor der Messung zugesetzt.

Zur Desialylierung wurde die Zellen einer 30-minütigen Behandlung mit 0,5 U/ml 2,3-Neuraminidase (NEB) und 0,2 U/ml Neuraminidase-Sialidase aus *Clostridium perfringens* (Roche) (α -2,3-Sialyl-Laktose: K_m = 1.6 mM; α -2,6-Sialyl-Laktose: K_m = 1.2 mM) in PBS + 1x BSA unterzogen. Während Tunicamycin die Bildung von Dolichol-Diphosphat-N-Acetylglucosamin hemmt, und damit die N-Glykosylierung komplett inhibiert, führt die Behandlung mit Swainsonin durch die Hemmung der Golgi-Mannosidase-II zur Anhäufung von Hybrid-Typ-Oligosacchariden an den Glykoproteinen, die dann einen Zweig mit einer

High-Mannose-Struktur und einen weiteren mit einer komplexen Glykan-Struktur aufweisen [Nichols et al., 1985] (siehe Abbildung 4).

3.2.3 Transiente Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen und den Transport fremder DNA in den Nukleus der transfizierten Zelle. Dort kann die DNA für mehrere Tage transkribiert werden, was als transiente Expression bezeichnet wird.

Ein geringer Prozentsatz der transfizierten Zellen integriert die fremde DNA stabil in ihr Genom und gibt sie bei einer Zellteilung an ihre Nachkommen weiter. Enthält die fremde DNA einen selektierbaren Marker wie die Resistenz gegen ein Antibiotikum, so können die stabil transfizierten Zellen mit dessen Hilfe isoliert, vereinzelt und zu monoklonalen, stabil transfizierten Zelllinien herangezogen werden.

Für die Transfektion von Säugetierzellen mit fremder DNA gibt es verschiedene Methoden [Cooper, 2000].

Elektroporation

Bei der Transfektion werden die Zellen einem kurzen elektrischen Puls ausgesetzt, der zu einer kurzfristigen Öffnung von Poren in der Zellmembran führt und so die Aufnahme der DNA in die Zelle ermöglicht [Cooper, 2000].

Transfektionen von Plasmid-DNA in Suspensionszellen wurden mittels Elektroporation mit den entsprechenden Nucleofector –Transfektionskits von Lonza Amaxa gemäß Tabelle 38 und den Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 38: **Bedingungen für die Elektroporation** der angegebenen Zelltypen mit den transfizierten Konstrukten (tf. mit) unter Angabe der transfizierten Zellzahl, der verwendeten Nucleofector-Lösung (NF-Lsg), dem eingestellten Elektroporationsprogram (Prog.), dem verwendeten Gerät und der Konzentration an β -Mercaptoethanol (β -ME) im Kultur-Medium nach Elektroporation.

Zelltyp	tf. mit	Zellzahl	NF-Lsg.	Prog.	Gerät	β -ME
E6.1	siRNA	3×10^6	V	X-005	NF II	nein
HMC1.2	siRNA	1×10^6	SF	DS-104	NF 4D	50 μ M
CD4	siRNA	6×10^6	T-Cell	U-014	NF II	nein

Die in Tabelle 39 und 40 angegebenen Konstrukte wurden in den entsprechenden Konzentrationen in je 100 μ l Nucleofector-Lösung eingesetzt.

Tabelle 39: **Konzentration der siRNA bei Elektroporation** unter Angabe der entsprechenden Zielgene sowie Zusammensetzung und eingesetzter Konzentration. Im Mix wurden ein gleichteiliges Gemisch aller im Materialteil angegebenen siRNAs für die jeweilige Ziel-mRNA verwendet.

Ziel-mRNA	Mix	Konzentration
ST6GAL1	nein	0,8 μ M
ST3GAL1	nein	0,8 μ M
ST3GAL4	nein	0,8 μ M
ST3GAL6	nein	0,8 μ M
Orai1-3'UTR	nein	3,2 μ M
Siglec-6	ja	3,2 μ M
Siglec-8	ja	3,2 μ M
ns (Qiagen)	nein	entsprechend zur siRNA
ns (Microsynth)	nein	entsprechend zur siRNA
ns mod. (Microsynth)	nein	entsprechend zur siRNA

Sofern nicht anders angegeben, wurden Transfektionen mit siRNA 48 h vor der Messung durchgeführt.

Tabelle 40: **Konzentration der Plasmide bei Elektroporation** unter Angabe der entsprechenden Konstruktbezeichnung.

Konstrukt	Konzentration
HA-Orai1 _{WT} -MO70 Δ citeGFP	0,01 μ M
HA-Orai1 _{N223A} -MO70 Δ citeGFP	0,01 μ M

Transfektion mit lipophilen Agenzien

Adhärente Zellen wurden mit lipophilen Agenzien transfiziert, die die DNA in Lipid-Vesikel einschließen und durch Verschmelzen mit der Plasmamembran ebenfalls die Aufnahme der DNA in die Zelle ermöglichen [Cooper, 2000].

Dazu wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert und das Kulturmedium vor Transfektion gegen Penicillin/Streptomycin freies Medium ausgetauscht. Die Transfektionen wurden gemäß Tabelle 41 nach Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 41: **Transfektionsbedingungen bei Verwendung lipophiler Transfektions Agenzien** unter Angabe der transfizierten Zelllinie, dem transfizierten Konstrukt (tf. mit) der Menge an transfizierter Nukleinsäure (DNA/ RNA) unter Angabe der Kulturfläche, dem verwendeten Transfektion-Agenz und dem eingesetzten Verhältnis von DNA und Transfektions-Agenz (DNA:Ag) in ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) bzw. miRNA-Mimic und Transfektions-Agenz (RNA:Ag) in ($\text{pmol}/\mu\text{l}$).

Zelllinie	tf. mit	DNA/RNA	Agenz	DNA/RNA:Ag
CHO	Plasmid	2,5 $\mu\text{g}/10 \text{ cm}^2$	Lipofectamine LTX	1:4,5
HEK-T	Plasmid	0,1 $\mu\text{g}/0,32 \text{ cm}^2$	FuGene HD	1:4
HEK	Plasmid	0,1 $\mu\text{g}/0,32 \text{ cm}^2$	Lipofectamine LTX	1:20,5
SKMEL5	Plasmid	0,1 $\mu\text{g}/0,32 \text{ cm}^2$	FuGene HD	1:3
HEK-T	Mimic	50 $\text{pmol}/0,32 \text{ cm}^2$	INTERFERin	1:0,08

3.2.4 Bestimmung der mRNA-Level

Herstellung von cDNA

Zur Bestimmung der Genexpression wurde die relative Menge an mRNA ermittelt, die dazu zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase in die komplementäre cDNA umgeschrieben wurde.

Wie alle Polymerasen benötigt auch die reverse Transkriptase einen *Primer*. Will man das gesamte Transkriptom einer Zelle (Gesamt-RNA) umschreiben, so verwendet man Oligo-dT-*Primer*, die komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA sind.

Die Isolation der RNA wurde mit TRIzol gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Nachdem die Qualität der isolierten RNA in einem 1 % Agarosegel überprüft wurde, wurden 0,8 μg für die reverse Transkription mit der Super Script II reversen Transkriptase nach Herstellerangaben eingesetzt.

qRT-PCR

Für die qRT-PCR wurde die cDNA, die aus der isolierten Gesamt-RNA umgeschrieben worden war, als Template mit einem Ziel-Gen spezifischen *Primer*-Paar eingesetzt. Durch die Verwendung DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe kann die Kinetik der PCR-Produkt Entstehung/Zeit erfasst und mit einem Referenzgen verglichen werden. Dies ermöglicht die Bestimmung der relativen Menge der nachzuweisenden mRNA.

Dafür wurden 0,5 μl cDNA und 300 nM *Primer* nach Herstellerangaben zusammen mit dem QuantiTect SYBR Green Kit (Qiagen) eingesetzt und die Spezifität mittels einer Schmelzkurve unter Verwendung des Bio-Rad CFX96 Real Time System bestimmt. Die Expression der Ziel-Gene wurde auf die Expression des Referenz-Gens TATA box binding protein (TBP) normiert. Die Temperatur-Zyklus-Konditionen für die durchgeführten qRT-PCR-Reaktionen sind in Tabelle 42 dargestellt.

Tabelle 42: **Temperatur-Zyklus-Konditionen für qRT-PCR-Reaktionen**

Zeit	Temperatur	
95 °C	15 min	
95 °C	30 s	x45
T _m (58 °C)	30 s	
72 °C	30 s	
95 °C	60 s	
60 °C - 95 °C	1 °C/5 s	

3.2.5 Proteinbiochemie

Herstellung von Zelllysaten

Um ein Proteinlysat herzustellen, wurden die entsprechenden Zellen zunächst mit DPBS gewaschen, durch Zentrifugation (30 min/700 g) pellettiert und für mindestens 24 h bei -80 °C eingelagert.

Zum Auftauen wurden die Pellets abhängig von der Pellet-Größe in ausreichend RIPA-Puffer resuspendiert (etwa 50 µl RIPA/10⁶ Zellen), dem zuvor 1x Proteinaseinhibitor und Benzonase 1:1000 zugesetzt worden war. Für eine 10x Proteinaseinhibitor-Lösung wurde eine Tablette Proteinaseinhibitor in 1 ml RIPA gelöst und für maximal 3 Wochen bei -20 °C gelagert.

Nach wiederholter Resuspension und Vortexen wurden die Lysate bei 15000 g/20 min/-4 °C zentrifugiert, der Überstand als aufgereinigtes Lysat überführt und gegebenenfalls eine Proteinbestimmung mittels Bicinchonin-Säure-Reaktion (BCA-Reaktion) durchgeführt. Die Lagerung von Lysaten erfolgte bei -80 °C.

Für die Analyse in SDS-Gelen wurden die Proteine in Laemmli-Puffer (2X oder 5X) bei 65 °C für 15 min denaturiert. Denaturierte Proben wurden bei -20 °C gelagert und vor dem Auftragen auf 37 °C erwärmt und resuspendiert.

Deglykosylierung von Zelllysaten

Für die Deglykosylierung von Proteinen in Zelllysaten durch PNGase F wurde Lysat mit 75 µg Gesamtprotein nach Herstellerangaben denaturiert und mit 1 µl PNGase F deglykosyliert.

Nach Zugabe von 5X Lämmli-Puffer wurden die Proben erneut bei 65 °C/15 min denaturiert und bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung bei -20 °C gelagert.

Proteinbestimmung

Die BCA-Reaktion (Bicinchonin-Säure-Reaktion) wird in der Biochemie zur quantitativen, photometrischen Bestimmung von Proteinen verwendet. Dabei reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen. Diese ergeben mit der

Bicinchonin-Säure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch ausgewertet werden kann.

Von der zu testenden Proteinlösung wurden 1:20, 1:100 und 1:200 Verdünnungen hergestellt. Parallel wurde eine BSA-Standard Stocklösung für die Aufnahme einer Eichgerade auf 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 und 0,1 mg/ml verdünnt. In einer 96-well Platte wurden 200 µl des nach Herstellerangaben angesetzten Reaktionsgemisches mit 25 µl der zu testenden Proteinlösungen beziehungsweise den BSA-Verdünnungen gemischt.

Die Platte wurde bei 65 °C für 45 min unter Schütteln inkubiert und anschließend im Spektralphotometer die Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt. Die Konzentration der zu testenden Proteinlösung wurde mit Hilfe der Eichgerade kalkuliert.

SDS-Page

Proteine können ebenfalls durch Elektrophorese getrennt werden. Als Gelmatrix benutzt man meist eine Acrylamid-Bisacrylamidmatrix. Will man Proteine der Größe nach trennen, so gibt man dem Probenansatz SDS im Überschuss hinzu. Das anionische Tensid überdeckt die Eigenladung der Proteine und bricht außerdem Sekundär- und Tertiärstrukturen auf.

Beta-Mercaptoethanol im Probenpuffer und eine Erwärmung der Probe auf 95 °C für 5 min bzw. 65 °C für 15 min führt dazu, dass auch Disulfidbrücken durch Reduktion gespalten werden.

Nach der Denaturierung werden die Proben auf einer Seite des Geles aufgetragen und bewegen sich beim Anlegen einer Spannung ihrer Größe entsprechend schnell zum Pluspol. Bei der diskontinuierlichen SDS-Page bewegen sich die Proteine zuerst in ein Sammelgel, in dem sie aufkonzentriert werden und anschließend in ein Trenngel, in dem die eigentliche Auftrennung erfolgt. Sammelgel und Trenngel unterscheiden sich in Porengröße und pH-Wert. Als Elektrolyt wird meist das SDS haltige TRIS-Glycin-Puffersystem eingesetzt.

Die Herstellung der Tris-Glycin-Gele erfolgte nach den Schemata in Tabelle 43 (Trenngel) und Tabelle 44 (Sammelgel)

Tabelle 43: **Pipettierschema für Trenngele**

	7%	10%	12%
Acrylamid (ml)	1,75	2,5	3
H ₂ O (ml)	5,66	4,91	4,11
2,5 ml Trenngelpuffer			
75 µl APS			
15 µl TEMED			
Gesamtvolumen 10 ml			

Sofern nicht anders angegeben, wurden für alle Versuche dieser Arbeit Gele mit 10%igem Trenngel und 5%igem Sammelgel verwendet. Gradienten-Gele wurden von der Firma Bio-Rad bezogen. Um von der Laufgeschwindigkeit eines Proteins auf die Größe schließen zu

Tabelle 44: **Pipettierschema für Sammelgele**

	4%	5%
Acrylamid (ml)	0,50	0,63
H ₂ O (ml)	3,21	3,08
1,25 ml Sammelgelpuffer		
37,5 µl APS		
7,50 µl TEMED		
Gesamtvolumen 5 ml		

können, wurde in einer Tasche jedes Geles der Größenmarker Dual Colour von Bio-Rad geladen.

Die Gele liefen anfangs mit einer Spannung von 80 mV. Diese wurde beim Eintritt der Laufrichtung in das Trenngel auf 150 mV erhöht.

Westernblot-Analyse

Um Proteine immunochemisch nachweisen zu können, müssen diese zunächst immobilisiert werden. Dazu transferiert man sie nach der SDS-Page mit einer quer zur Laufrichtung angelegten Spannung vom Gel auf eine Nitrozellulose oder PVDF-Membran, wo sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben.

Der Transfer erfolgte bei allen Versuchen dieser Arbeit bei 350 mA und 4 °C für 90 min auf eine Methanol-aktivierte PVDF Membran. Nach dem Transfer wurden die Markerbanden auf dem Gel markiert.

Um unspezifische Bindungstellen zu blockieren, wurde die Membran nach dem Transfer für 1 h bei RT in 5 % Magermilchlösung (in TBST-Puffer) inkubiert, anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Antigen-spezifischen Primärantikörper für mindestens 16 h bei 4 °C. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges, je zehnminütiges Waschen in TBST entfernt. Die Membran wurde dann für mindestens 1 h mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper behandelt. Nicht gebundener Sekundärantikörper wurde durch Waschen entfernt (zweimal 10 min in TBST). Für den letzten zehnminütigen Waschschriff wurde TBS eingesetzt, da Tween 20 die ECL-Reaktion stört.

Zur genauen Bestimmung von Molekulargewichten, wurden die Banden-Dichten mit der Image-Lab Software von Bio-Rad bestimmt und abhängig von der Laufstrecke aufgetragen. Über die Laufstrecken der Marker-Banden wurde eine Standardkurve ermittelt. Für die Maxima der Bandendichte wurden die Laufstrecken abgelesen und mit Hilfe der Standardkurve in die entsprechenden Molekulargewichte umgerechnet.

Easternblot-Analyse

Beim Easternblot werden Proteine analog zum Westernblot aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgt jedoch nicht über eine spezifische Antikörperbindung.

In dieser Arbeit wurden biotinylierte Lektine zum Nachweis glykosylierter Proteine eingesetzt. Dazu wurde die Membran zunächst mit 0,5 % PVA (Poly(vinylalkohol)) für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) geblockt und anschließend mit 1 µg/ml biotinyliertem Lektin für 30 min bei RT inkubiert.

Nach Waschen in PBS mit 0,1 % Tween (PBST) wurden die biotinylierten Lektine mit HRP-gekoppeltem Avidin (1:5000 in 0,5 % PVA + 0,1 % Tween) konjugiert und nach erneutem Waschen in PBST und PBS mittels ECL visualisiert.

ECL-Reaktion

Mit der ECL (Enhanced Chemi Luminescence) Reaktion lassen sich Peroxidase gekoppelte Antikörper detektieren. Dabei oxidiert die Peroxidase unter Reduktion von Wasserstoffperoxid Luminol, was mit einer Emission von Licht einhergeht.

Die ECL-Detektion wurde mit dem Clarity Western ECL-Kit von Bio-Rad entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Nach einer Entwicklungszeit von 60 s wurde mit dem Gel-Dokumentationssystem von Bio-Rad die Chemilumineszenz über einen Zeitraum von 2 h alle 5 min aufgezeichnet.

Für Easternblots wurde die Entwicklungszeit auf 10 s und 30 s reduziert. Anschließend wurde die Membran einmal fotografiert (Weißbild). Für die Auswertung wurde die geeignetste Entwicklungsdauer mit dem Weißbild kombiniert und die Bandendichte mit der Image Lab Software (Bio-Rad) bestimmt.

Northernblot-Analyse

Während bei den Analysemethoden Western- und Easternblot Proteine detektiert werden, können im Northernblot RNA-Moleküle mit Hilfe radioaktiv markierter Sonden nachgewiesen werden.

Dazu wurde die isolierte RNA zunächst in einem 15 % Urea-Gel (Sequagel) der Größe nach aufgetrennt. Nach dem Semi-Dry-Blotting auf Nylon-Membran (Hybond-N) für 30 min bei 15 V, wurde die RNA im Hybridisierungssofen für 2 h bei 55 °C und anschließend für 5 min bei 50 °C in Crosslinking-Puffer kreuzvernetzt und in Hybridisierungspuffer über Nacht mit den entsprechenden radioaktiv markierten Sonden inkubiert.

Als Basis für die Sonden dienten DNA-Oligonukleotide (MWG). Diese bestanden aus der revers-komplementären Sequenz zur Ziel-mRNA, die am 3' Ende um die Basenfolge 5'-CCTGTCTC-3' verlängert wurde. Diese Basenfolge ist komplementär zu dem verwendeten T7-Promotor-*Primer*, so dass nach *Fill-In*-Reaktion mit der Klenow-Polymerase ein cDNA-Template mit T7 Promotor entstehen konnte. Mit der T7-Polymerase konnte unter Zusatz von radioaktiv markierten Nucleotiden (UT³²P) daraus die entsprechende, radioaktiv markierte mRNA transkribiert werden. Die Template Synthese und Umschreibung erfolgt nach Herstellerangaben gemäß des miVana miRNA Probe Construction Kits (AM 1550). T7-Promotor-*Primer*, T7-Polymerase, dNTPs, Klenow-Polymerase, radioaktiv markierte

UT³²Ps und die entsprechenden Puffer wurden dabei von alternativen Herstellern bezogen und in den im Kit angegebenen Verdünnungen eingesetzt.

Vor dem Entwickeln wurde der Blot 2-mal in 5x SSC (saline sodium citrate)/1 % SDS und anschließend in 1x SSC/1 % SDS für jeweils 15 min bei 50 °C gewaschen. Für die Entwicklung wurde über Nacht ein „Storage Phosphor Screen“ aufgelegt und das Signal anschließend mit dem Typhoon Scanner dokumentiert.

Detektion von Oberflächenproteinen durch Biotinylierung

Um den Anteil eines Proteins zu bestimmen, der an der Zelloberfläche exprimiert wird, kann eine Biotinylierung durchgeführt werden. Hier wurde Sulfo-NHS-SS-Biotin verwendet. Die NHS-Ester-Gruppe des Reagenz reagiert mit den primären Aminen von Lysinresten sowie dem N-Terminus von Proteinen und bildet ein stabiles Produkt. Durch seine Ladung kann das Reagenz die Zellmembran nicht durchdringen: es werden nur Oberflächenproteine mit Biotin konjugiert.

Diese können an Streptavidin-gekoppelte magnetische Partikel binden und so von unkonjugierten Proteinen getrennt werden.

Für Biotinylierungsexperimente wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBSB pH 8,0 (2500 g/5 min) mit 1 mg/ml Biotin (in PBS pH 8,0) für 30 min bei 4° C unter Wiegen inkubiert (etwa 10×10^6 Zellen/ml). Nach dreimaligem Waschen (2500 g/5 min) in PBS pH 8.0 mit 100 mM Glycin und zweimaligem Waschen (2500 g/5 min) in PBS pH 7.4 wurden die Zellen pelletiert und bei -80 °C gelagert.

Nach Lyse in RIPA-Puffer wurden 375 µg Gesamtlysate in 300 µl TBS mit 100 µl Streptavidin-*Beads* inkubiert (30 min/4°C) und entsprechend der Herstellerangaben nach Waschen in TBS pH 7.5 + 2 M Urea zweimal in 50 µl 2x Lämmli-Puffer bei 95 °C/5 min eluiert (Eluat). Zur Kontrolle der Gesamtproteinkonzentration wurden 50 µg des unaufgereinigten Gesamtzelllysates (Lysat) und zur Kontrolle des unbiotinylierten Proteinanteils 50 µg des Durchflusses (Durchfluss) in 5x Lämmli-Puffer denaturiert (65 °C/15 min).

Auftrennung, Detektion und Auswertung wurde wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben durchgeführt.

Chemische Quervernetzung von Proteinen

Um interagierende Proteine und Untereinheiten stabil miteinander zu verbinden und die Interaktion über eine Aufreinigung hinweg stabil für den Nachweis zu erhalten, können Proteine mittels chemischer Substanzen miteinander vernetzt werden (*Cross-Linking*).

Alle *Cross-Linking*-Versuche dieser Arbeit wurden mit dem membran-permeablen *Cross-Linker* DSP (dithiobis(succinimidyl propionate) durchgeführt. Wie das verwendete Biotinylierungsreagenz enthält auch das kurze lineare DSP an beiden Enden NHS-Ester-Gruppen, die mit den primären Aminen von Lysinresten sowie dem N-Terminus von Proteinen reagieren und stabile Amid-Bindungen bilden. Dazu wurde DSP in DMSO gelöst

und gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Da die Schwefel-Brücke in DSP durch reduzierende Agenzien gespalten werden kann, wurde für die Denaturierung DSP-behandelter Proben nicht-reduzierender SDS-Puffer eingesetzt.

Selektive Aufreinigung von sialylierten Proteinen

Für quantitative Analysen der Sialylierung von Orail wurden 100 µl SNA-Agarose-*Beads* (SNA-*Beads*) nach dreimaligem Waschen mit HEPES + 0,01 % Tween (HEPES-T) (Zentrifugation bei 100 g für 1 min) mit 170 µg (Lymphozyten, Jurkats) bzw 250 µg (HMC1.2, SKMEL5, WM3734) Gesamtproteinlysate nach Auffüllen auf 100 µl Gesamtvolumen mit HEPES + 1x Complete) für 2h bei 4°C inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen mit HEPES-T und zweimaligem Waschen mit HEPES wurden gebundene Proteine durch Inkubation mit 80 µl 0,5 M Laktose in 0,2 M Essigsäure für 15 min bei 37 °C eluiert und das Eluat mit 20 µl 1 M Tris H 9.5 neutralisiert.

Für die Analyse der relativen Retention an SNA-Agarose wurden 75 µg unaufgereinigtes Gesamtzelllysate (Input), 75 µg Überstand nach der Aufreinigung (Durchfluss) und 50 µl Eluat in 5x-Lämmli-Puffer für 15 min bei 65 °C denaturiert. Auftrennung, Detektion und Auswertung wurde wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben durchgeführt.

Für qualitative Analysen der Bindungsaffinität an SNA und MAH, wurden 25 µl Avidin-Agarose-*Beads* nach dem Waschen gemäß Herstellerangaben mit 2 nMol biotinyliertem SNA/MAH für 4 h bei 4 °C inkubiert (selbstgekoppelte SNA/MAH-*Beads*). Anschließend wurde dieses Gemisch für 4 h bei 4 °C mit dem Zelllysate inkubiert. Nach viermaligem Waschen in PBS erfolgte die Elution in 2x Lämmli-Puffer bei 95 °C für 5 min. Auftrennung, Detektion und Auswertung wurde wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben durchgeführt.

Selektive Aufreinigung von HA-konjugierten Proteinen

Zur Aufreinigung HA-konjugierter Proteine wurde α-HA-Agarose von Thermo Scientific gemäß den Herstellervorgaben eingesetzt. Zur Elution wurden 50 mM NaOH verwendet und die Eluate anschließend mit 1:10 Tris pH 6,8 (1 M) neutralisiert.

3.3 Messung von Ca²⁺-Strömen

3.3.1 Elektrophysiologische Messungen: Patch-Clamp

Um Einflüsse regulierender Faktoren auf den Stromverlauf und die Stromstärke von I_{CRAC} genau messen zu können, umfassten mehrere Messreihen Patch-Clamp-Messungen im *Whole-Cell*-Modus. Die Patch-Clamp-Technik ist eine Messmethode der Elektrophysik, die mit Hilfe sehr dünner und spitzer Glaspipetten die Messung von Strömen durch Ionenkanäle der Zellmembran ermöglicht.

Um den *Whole-Cell*-Modus zu erreichen, wurde zwischen Zelle und Patchpipette durch einen leichten Unterdruck zunächst ein Gigaseal (eine elektrisch dichte Verbindung zwischen

Pipette und Membran) hergestellt. Danach wurde durch einen kurzen, stärkeren Unterdruck das Membranstück unter der Pipettenöffnung aufgerissen und so ein leitender Zugang zur Zelle hergestellt. Alle Messungen wurden mit polierten Pipetten mit Widerständen von etwa 3-5 Megaohm [$M\Omega$] durchgeführt. Je nach Zelltyp und Fragestellung wurden die Messungen in den angegebenen Badlösungen (Externe Patch-Lösung) in Tabelle 12 unter Verwendung der entsprechenden Pipettenlösung (Interne Patch-Lösung) in Tabelle 13 durchgeführt.

Die Aktivierung von CRAC erfolgte mittels 0,05 mM IP₃, das der Pipettenlösung zugegeben wurde. Nach Erreichen der *Whole-Cell*-Konfiguration diffundiert IP₃ ins Cytosol und bewirkt durch Bindung an den IP₃-Rezeptor die Speicherentleerung und dadurch die Aktivierung von CRAC.

Messungen wurden je nach Zelltyp und Fragestellung entsprechend der Rampen-Protokollen in Tabelle 45 durchgeführt. Die Rampen, von denen jede 50 ms andauerte, wurden dabei alle 2 s von einem Haltepotential von 0 mV aus neu gestartet.

Tabelle 45: **Verwendete Rampenprotokolle** unter Angabe von Zelltyp, Behandlung (O1/S1 ÜE = Orail/STIM1 Überexpression), Minimal- und Maximal-Spannung der angelegten Spannungsrampe sowie der Spannung, bei der die Stromstärke zur Darstellung der Stromstärke-Entwicklung extrahiert wurde.

Zelltyp	Behandlung	Spannungsrampe	Strom extrahiert bei
E6.1	PHA	-100 mV - +100 mV	-80 mV, +80 mV
E6.1	Laktose	-150 mV - +100 mV	-130 mV, +80 mV
CHO	O1/S1 ÜE	-150 mV - +150 mV	-130 mV, +130 mV
HMC1.2	NaClO ₃	-150 mV - +100 mV	-130 mV, +80 mV

Die Kapazität von Pipette und Zelle wurde vor jeder Rampe elektronisch durch den Patch Clamp Amplifier kompensiert, dessen Steuerung durch die Patchmaster Software (HEKA) erfolgte. Um Leckströme zu kompensieren, wurde die erste Rampe vor Aktivierung des Kanals von allen gemessenen Rampen abgezogen. Alle Spannungen wurden um ein *Liquid-Junction*-Potential von -10 mV korrigiert.

Die gemessenen Ströme wurden bei 2,9 kHz gefiltert und digitalisiert, die aufgezeichneten Ströme bei denen in Tabelle 45 angegebenen Spannungen extrahiert und auf die Zellgröße normalisiert (Stromdichte), was eine Aussage über die Entwicklung des Stromes nach Kanalaktivierung erlaubt.

Alle Zellen mit einem Initialstrom von mehr als -10 pA/pF und signifikante Ausreißer ($P < 0,001$ Grubb's Test) wurden ausgeschlossen.

3.3.2 Messungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2 AM

Für die Messung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden Fluoreszenzmessungen mit dem Ca^{2+} -Chelator Fura-2 AM durchgeführt, dessen Fluoreszenzverhalten direkt abhängig von der vorliegenden Ca^{2+} -Konzentration der umgebenden Lösung ist.

Fura-2 AM kann mit UV-Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm angeregt werden. Die Emission wird bei 510 nm gemessen. Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration führt gleichzeitig zu einer Zunahme der Fluoreszenz bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 340 nm und einer Abnahme bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 380 nm. Während die Fluoreszenz bei 340 und 380 nm zusätzlich zur Ca^{2+} -Konzentration noch von der Konzentration des Farbstoffes, der Dicke der Zelle und den Eigenschaften der Messapparatur abhängt, können diese drei Größen durch Bildung des Quotienten gekürzt werden, so dass der Quotient der Fluoreszenz (F) $F_{\text{bei } 340\text{nm}}/F_{\text{bei } 380\text{ nm}} = \text{Ratio } F^{340}/F_{380}$ eine direkte Aussage über die Ca^{2+} -Konzentration liefert.

Bei Fura-2 AM handelt es sich um einen Acetomethyl-Ester, bei dem die polaren Carboxylatgruppen verestert wurden. Das unpolare Molekül kann deshalb bei Inkubation mit den zu messenden Zellen die Zellmembran durchdringen. Sobald Fura-2 AM im Zellinnern ist, wird die Acetomethyl-Gruppe durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert und der nun wieder polare Farbstoff kann die lipophile Zellmembran nicht mehr überwinden.

Die komplette Messvorbereitung, das Laden mit Fura und die Messung wurden in naiven Lymphozyten, Jurkat-T-Zellen, HMC1.2-Zellen, CHO-Zellen und SKMEL-Zellen bei Raumtemperatur und in WM3734-Zellen bei 37 °C durchgeführt.

Zur Messung von Suspensionzellen wurden Objektträger zunächst mittig mit ~50 µl p-Ornithin (0,1 mg/ml) für 15-60 min beschichtet, wobei der Flüssigkeitsfilm kurz vorm Aufbringen der Zellen entfernt und die Zellen in ~50 µl Medium auf die gleiche Stelle appliziert wurden. Bis zum Start der Messung wurden die Zellen mindestens 10 min auf den poly-Ornithin beschichteten Objektträger belassen.

Alle Messungen wurden mit einem 20x Objektiv (UApo/ 340, N.A. 0.75) aufgenommen und sowohl zur Aufnahme wie auch Auswertung der Fluoreszenz das Programm TillVision verwendet. Dazu wurde für jede Zelle eine ROI (region of interest) definiert und Änderungen der Fluoreszenzintensität über die Zeit bestimmt, wobei die in zellfreien Bereichen ermittelte Hintergrundfluoreszenz von den Messwerten subtrahiert wurde. Gleichzeitig wurde aus der Fluoreszenz nach Absorption bei 340 und 380 nm das Ratio (F^{340}/F_{380}) gebildet und mit Microsoft Excel graphisch ausgewertet. Zu Überprüfung der Zellvitalität wurde mit jeder Aufnahme der Fluoreszenz auch ein Transmissionsbild unter Infrarot-Licht aufgenommen.

Während die Ratio F^{340}/F_{380} -Werte einen zuverlässigen Anhaltspunkt für relative Unterschiede im SOCE unter verschiedenen Bedingungen bieten, lassen sich mit ihnen nach der von [Gryniewicz et al., 1985] beschriebenen Kalibrationsgleichung auch die absoluten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen ermittelt.

$$\text{Ca}^{2+} = K_d \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \left(\frac{F_{f380}}{F_{b380}} \right)$$

K_d : Dissoziationskonstante; für Fura-2 AM bei 37°C = 224 nM

R : Ratio: Quotient aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei 340 und 380 nm

R_{\min} : Ratio-Wert in Ca^{2+} -freier Lösung

R_{max} : Ratio-Wert in 20 mM CaCl_2

F_{f380} : Fluoreszenzintensität von freiem Fura-2 AM (in Ca^{2+} -freier Lösung)

F_{f380} : Fluoreszenzintensität Ca^{2+} gebundenem Fura-2 AM (in 20 mM CaCl_2)

Zur Ermittlung der maximalen und minimalen Ratio- und Fluoreszenzwerte wurden den verwendeten Imaging-Lösungen 4 μM Ionomycin zugesetzt. Nach Start der Messung in 0,5 mM CaCl_2 -Lösung wurden die Zellen mit 0 mM CaCl_2 Imaging-Lösung perfundiert und R_{min} (minimales Ratio F_{f340}/F_{f380}) sowie F_{f380} ermittelt.

Um R_{max} (maximales Ratio F_{f340}/F_{f380}) und F_{f380} aufzuzeichnen, wurden die Zellen mit 20 mM CaCl_2 -Lösung perfundiert. Mit Hilfe der aufgezeichneten Maximal- und Minimal-Werte konnte anschließend zu jedem gemessenen Ratio F_{f340}/F_{f380} Wert die entsprechende Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]$ berechnet werden, wobei die Kalibration für jeden Zelltyp und jede Änderung am Messplatz neu durchgeführt wurde.

Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin

Je nach Angabe erfolgte im entsprechenden Zeitabstand zur Messung eine Transfektion oder Behandlung mit den angegebenen Nukleinsäuren bzw. Substanzen. Unmittelbar vor der Messung wurden die Zellen 20 min bei Raumtemperatur mit 1 $\mu\text{l/ml}$ Fura-2 AM (Stocklösung 1 mg/ml in DMSO) in 1 ml Medium geladen. Die Messung selbst wurde gemäß dem Ca^{2+} -*Readdition*-Protokoll durchgeführt.

Ca^{2+} -*Readdition*-Protokoll: Nach Einsetzen in die Messapparatur wurden die Zellen zunächst mehrmals mit einer 0,5 mM CaCl_2 -Lösung gespült um extrazelluläres Fura-2 AM zu entfernen. Nach dem Starten der Messung wurden die Zellen zunächst für 20 s in 0,5 mM CaCl_2 -Lösung gemessen bevor dann eine 0 mM CaCl_2 -Lösung perfundiert wurde, um die Basislinie aufzuzeichnen. Über die Perfusionsanlage wurde 400 s nach Start der Messung eine 0 mM CaCl_2 -Lösung mit Thapsigargin zugegeben, um die Thapsigargin induzierte Entleerung der Ca^{2+} -Speicher (Endoplasmatisches Retikulum) zu messen.

Thapsigargin inhibiert die Funktion der SERCA-Pumpen, die normalerweise Ca^{2+} aus dem Zytosol ins ER pumpen. Durch ständige Ca^{2+} -Leck-Ströme aus dem ER wird dieses nach Inhibition der SERCAs entleert.

Nach einer Messzeit von 1400 s wurde die Lösung schließlich gegen eine CaCl_2 -haltige Lösung (0,25 - 1,5 mM) mit Thapsigargin (1 $\mu\text{g/ml}$) ausgetauscht, um den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom von außen in die Zelle zu beobachten.

Bei der Messung von Plasmid-transfizierten Zellen wurde die Transfektionseffizienz zusätzlich durch die entsprechende Fluoreszenz (GFP, RFP) überprüft. Alle nicht fluoreszierenden Zellen, sowie Zellen mit einem ungewöhnlich hohen Ca^{2+} -Signal zu Beginn der Messung (präaktiviert) wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Sofern nicht anders angegeben, wurden bei der Analyse mittels Microsoft Excel die Ca^{2+} -Einstromrate unmittelbar nach Aktivierung von SOCE (Perfusion mit Ca^{2+} -haltiger

Imaging-Lösung + 1 µg/ml Thapsigargin), die maximale Ca^{2+} -Konzentration nach Aktivierung von SOCE ($[\text{Ca}^{2+}]$ Peak), sowie die Ca^{2+} -Konzentration 5 min nach Aktivierung von SOCE ($[\text{Ca}^{2+}]$ Plateau) bestimmt. Wurde keine entsprechende Kalibrierungsmessung durchgeführt so wurde aus den Ratio $\text{F}^{340}/\text{F}_{380}$ -Werten der Einstrom $[\text{F}^{340}/\text{F}_{380} * \text{min}^{-1}]$, der Ratio Peak = Peak $[\text{F}^{340}/\text{F}_{380}]$ und das Ratio Plateau = Plateau $[\text{F}^{340}/\text{F}_{380}]$ ermittelt.

Aktivierung von SOCE durch α -CD3/ α -CD28-Aktivator-Beads

Zur rezeptorvermittelten Aktivierung von SOCE wurden unmittelbar vor der Messung 10 µl α -CD3/ α -CD28 konjugierte *Beads* in die Messkammer appliziert. Durch Stimulation des TCR bei Bead-Kontakt wird in den entsprechenden Zellen ebenfalls ein speichergesteuerter Ca^{2+} -Einstrom induziert.

Die komplette Messung wurde in 0,5 mM CaCl_2 -Lösung durchgeführt und für die Analyse nur Zellen mit detektiertem Bead-Kontakt (Infrarot-Aufnahmen) berücksichtigt. Zur Analyse der Einstromrate wurde die zweite Phase des Ca^{2+} -Einstroms nach *Bead*-Kontakt ausgewertet.

Versuchsspezifische Bedingungen in den durchgeführten Ca^{2+} -Imaging-Experimenten

Messungen zum Einfluss von PHA auf I_{CRAC} und SOCE Um den Einfluss von PHA auf SOCE und I_{CRAC} zu messen, wurde den Jurkat-T-Zellen 5 min vor der Messung bei RT 10 µg/ml PHA zugesetzt und der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom mittels Ca^{2+} -*Readdition*-Protokoll in Imaging-Messungen bzw. I_{CRAC} in Patch-Messungen bestimmt.

Um den Einfluss von PHA auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration zu messen, wurden die Messungen in 0,5 mM CaCl_2 -Lösung gestartet und 250 s nach Messbeginn 10 µg/ml PHA in 0,5 mM CaCl_2 -Lösung perfundiert.

Messungen zum Einfluss von Laktose auf I_{CRAC} und SOCE Um den Einfluss von Laktose auf SOCE und I_{CRAC} zu messen, wurden Jurkat-T-Zellen vor der Messung 30 min bei RT mit 10 mM Laktose inkubiert und der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom mittels Ca^{2+} -*Readdition*-Protokoll in Imaging-Messungen bzw. I_{CRAC} in Patch Clamp Messungen bestimmt.

Messungen zum Einfluss von Apo1.1 auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration Um den Einfluss von Apo1.1 auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu bestimmen, wurden Jurkat-T-Zellen 400 s nach Messbeginn mit 0,1 µg/ml Apo1.1 und 10 µg/ml Protein A in 0,5 mM CaCl_2 -Lösung perfundiert.

Messungen zum Einfluss von NaClO_3 auf I_{CRAC} und SOCE Um den Einfluss von NaClO_3 auf SOCE und I_{CRAC} zu messen, wurden HMC1.2-Zellen vor der Messung 7

d in 50 mM NaClO₃ kultiviert und der speichergesteuerte Ca²⁺-Einstrom mittels Ca²⁺-*Readdition*-Protokoll in Imaging-Messungen bzw. I_{CRAC} in Patch-Clamp-Messungen bestimmt.

3.4 Apoptosemessungen

Für Apoptosemessungen wurden die pCasper3-GR stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen verwendet. Bei dem pCasper3-GR Konstrukt handelt es sich um einen FRET-basierten Sensor, der zur Detektion Caspase-3-vermittelter Apoptose in lebenden Zellen verwendet werden kann.

Er besteht aus den rot- und grün-fluoreszierenden Proteinen GFP und RFP. Beide sind über eine Verbindungssequenz verknüpft, die die Schnittstelle von Caspase-3 enthält (DEVD). Durch die räumliche Nähe und Überlappung der Wellenlänge von GFP-Emission (Donor) und RFP-Exzitation (Akzeptor) kommt es zu FRET zwischen den Proteinen, die bei Exzitation von GFP als Emission von RFP gemessen werden kann.

FRET (Förster Resonanzenergietransfer) beruht auf der strahlungslosen Energieübertragung, die 1948 erstmals von Theodor Förster beschrieben wurde [Förster, 1948]. Dabei wird die Energie eines angeregten Donor-Farbstoffes strahlungsfrei auf einen zweiten Akzeptor-Farbstoff übertragen und somit nicht über die Abgabe und Aufnahme von Photonen ausgetauscht.

Die Aktivierung von Caspase-3 im Verlauf der Apoptose führt zum Schneiden der DEVD-Sequenz und unterbindet dadurch das FRET-Signal, was als Abnahme der Emission im Rot-Bereich und einer Zunahme im Grün-Bereich gemessen werden kann.

Um Änderungen in der relativen Anzahl apoptotischer Zellen zu ermitteln, wurden stabil pCasper3-GR exprimierende Jurkat-T-Zellen in 0,5 mM CaCl₂ Imaging-Lösung entsprechend der Ca²⁺-Imaging-Messungen auf p-Ornithin-beschichteten Objektträgern immobilisiert und mit 0,5 mM CaCl₂ Imaging-Lösung gewaschen. Die Messung erfolgte ebenfalls in 0,5 mM CaCl₂ Imaging-Lösung.

Nach Applikation von Apo1.1 (1 µg/ml sofern nicht anders angegeben) gegebenenfalls in Kombination mit Protein A 10 µg/ml und α-Maus 2 µg/ml zur Funktionsoptimierung des Antikörpers über *Cross-Linking*, wurden die Zellen im Cell-Observer über 3 h sowie im Bio-Imager über 14 h gemessen.

Bei den Messungen im Cell-Observer wurde der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen durch Vergleich von Gesamtzellzahl und Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen ermittelt. Apoptotische Zellen wurden durch Verlust des FRET-Signals und nekrotische Zellen durch den kompletten Verlust der Fluoreszenz identifiziert.

Dabei betrug die Belichtung 120 ms im GFP Kanal bei einer LED-Intensität von 25 % und im FRET-Kanal 360 ms im Intervall von jeweils 10 s. Für FRET wurde der GFP-Anregungsfilter zusammen mit dem dichroiden Spiegel und dem RFP-Emissionsfilter eingesetzt (s. Tab. 10).

Die Messungen im Bio-Imager ermöglichten die gleichzeitige Messung mehrerer Proben und Bedingungen in kleineren Volumina (96 well). Mit Hilfe des 10x Objektives (Olympus) wurde das FRET-Signal etwa alle 7 Minuten aufgezeichnet, wobei für die Anregung ein GFP-Filter und für die Emission der RFP-Long-Pass-Filter in Kombination mit einem Strahlenteiler verwendet wurde (s. Tab. 6). Für die Auswertung wurde die Hintergrundfluoreszenz abgezogen (*Image J/Rolling Ball Algorithm*) und die Gesamtfluoreszenz aller Zellen eines Wells ermittelt.

3.5 Messungen der Luciferaseaktivität

3.5.1 Messungen zum Einfluss von miRNAs

Um den Einfluss von miRNAs auf die Reporterogenaktivität und damit auf die Expression von Ziel-3'UTR-konjugierten Genen zu messen, wurde die zu testende Ziel-3'UTR in den dualen Vektor pMir_TK-Ren kloniert, der sowohl das Gen für Firefly-Luciferase unter der Kontrolle eines CMV-Promotors, wie auch das Gen für Renilla-Luciferase unter der Kontrolle eines TK-Promotors exprimiert (vergleiche Abbildung 10).

Die Klonierung der Ziel-3'UTR erfolgte dabei unmittelbar hinter die kodierende Sequenz für die Firefly-Luciferase, so dass bei Transkription eine Hybrid-mRNA aus Firefly-Luciferase und Ziel-3'UTR gebildet wird. Die Aktivität der Firefly-Luciferase hängt von der gebildeten Menge an Protein und damit von der mRNA-Stabilität bzw. der Translationseffizienz und somit dem Einfluss potentiell interagierender miRNAs ab.

Da die Expression der Renilla-Luciferase unabhängig vom potentiellen Einfluss der getesteten miRNAs konstitutiv erfolgt, werden durch Kalkulation des Quotienten aus Firefly-/ Renilla-Luciferaseaktivität alle Einflüsse auf die Reportergen-Aktivität wie Transfektionseffizienz, Zellzahl und Sensitivität der Messapparatur aus der Gleichung gekürzt, so dass nur Änderungen in der relativen Menge translatierter Firefly-Luciferase mRNA im Vergleich zur Menge translatierter Renilla-Luciferase-mRNA einen Einfluss auf den Quotienten haben.

Alle Messungen der Luciferaseaktivität wurden 48 h nach Transfektion in weißen 96-Well-Platten durchgeführt. 24 h nach Transfektion wurden jedem Well 100 µl Medium mit der zweifachen Konzentration der üblichen Antibiotika-Menge zugesetzt. Die Lumineszenz wurde im Plate-Reader Genius Pro II über 100 ms ermittelt. Als Maß für die relative Menge an Reportergen-mRNA wurde der Quotient aus Firefly-Luciferase- und Renilla-Luciferaseaktivität gebildet ($\text{Luc}_{\text{Ff}}/\text{Luc}_{\text{Ren}}$) und gegebenenfalls normiert.

Potentiell bindende, konservierte miRNAs wurden mit Hilfe der Online-Datenbank targetscan.org ermittelt (Release 6.2: June 2012) und in den Expressionsvektor pSG5 kloniert. Zur Bestimmung des Einflusses der verschiedenen miRNAs (hsa-miR 34c, hsa-miR 148a und hsa-miR 449a) wurden HEK293T-Zellen mit dem Reportervektor (pMir_TK-RNL-Konstrukte) und dem miRNA-Vektor (pSG5-Konstrukte) gemäß Kapitel 3.2.3 im Verhältnis 4:1 transfiziert.

Zur Bestimmung des Einflusses von miRNA-mimics (entsprechend hsa-miR 449a, hsa-miR 661) wurden die Zellen zunächst mit den miRNA-mimics und 4 h nach Wechsel des Mediums zusätzlich mit den entsprechenden Reportervektoren (pMir_TK-RNL Konstrukte) transfiziert.

Die Aktivität von Firefly- und Renilla-Luciferase wurde gemäß Herstellerangaben mit dem Dual Glow Luciferase Assay System (E2920) nach jeweils 20 min Inkubation bestimmt.

3.5.2 Messungen der Promotoraktivität

Zur Bestimmung der Promotoraktivität wurde die CMV-Promotorsequenz aus dem dualen Reportervektor pMir_TK-RNL entfernt und durch eine AfeI-Schnittstelle ersetzt, über die ungefähr 1000 bp aus der 5'UTR im Bereich um den prognostizierten Promotor von Orai1 und Orai3 in den Vektor kloniert werden konnten (vergleiche Abbildung 12). Die Transkription der Firefly-Luciferase erfolgte damit unter Kontrolle der Orai-Promotoren. SKMEL5 und HEK293-Zellen wurden 48 h vor der Messung mit den Reporter-Konstrukten transfiziert. Die Aktivitäten von Firefly-Luciferase und Renilla-Luciferase wurden gemäß Herstellerangaben mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (E1910) unmittelbar nach simultaner Applikation in alle Proben bestimmt.

3.6 Signifikanz

Insofern nicht anders angegeben, wurde die Signifikanz der Messergebnisse mittels des Student's t-Test überprüft.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Validierung der Glykosylierung von Orai1

Sehr viele Plasmamembranproteine weisen Konsensussequenzen (NXS/T) für N-glykosidische Modifikationen auf, die jedoch in extrazellulären Proteindomänen liegen müssen, um tatsächlich mit Glykanen verknüpft zu werden. Orai1, nicht aber seine beiden Homologen Orai2 und Orai3, weist eben eine solche Konsensussequenz auf. Um zu zeigen, dass Orai1 nicht nur theoretisch glykosyliert werden kann, sondern endogen auch glykosyliert wird, wurde die Glykosylierung von Orai1 in verschiedenen Zellsystemen, wie nachfolgend beschrieben, untersucht.

Um die Glykosylierung von Orai1 in dem Zellmodell zu zeigen, das Immunzellen physiologisch am nächsten kommt, wurde eine stabile Zelllinie hergestellt, die HA-gekoppeltes Orai1 entweder in der Wildtypform (Orai1_{WT}) oder in Form der nicht-glykosylierbaren Mutante Orai1_{N223A} exprimiert.

Bei Detektion mit dem HA-Tag Antikörper α -HA war im Westernblot deutlich erkennbar, dass HA-Orai1 bei Expression von HA-Orai1_{WT} hauptsächlich mit einem Molekulargewicht von ~ 50 kDa und ein kleinerer Anteil (~ 6 %) mit einem Molekulargewicht von ~ 35 kDa synthetisiert wurde. Bei Expression der Glykosylierungsmutante HA-Orai1_{N223A} konnte hingegen nur HA-Orai1 mit einem Molekulargewicht von ~ 35 kDa detektiert werden (s. Abb. 13A).

Weil die glykosylierungsdefizienten Ovarien-Zellen des Chinesischen Hamsters (CHO) die Synthese von ausschließlich *core*-glykosyliertem Orai1 ermöglichen, wurden als weiteres Zellsystem CHO-Zellen eingesetzt. Von diesen Zellen existieren viele verschiedene Zelllinien, die eine oder mehrere Glykosyltransferasen nicht mehr exprimieren. Bei der von uns verwendeten Lec_{3.2.8.1}-Mutante (CHO_{Lec}) werden N-Glykosylierungen nur bis zur Mannose-5-Oligomannosyl-Form und O-glykosidisch verknüpfte Kohlenhydrate mit einem einzigen N-Acetylgalactosamin synthetisiert [Stanley, 1989], was die Synthese von lediglich *core*-glykosyliertem Orai1 erlaubt. Da CHO-Zellen wenig endogenes Orai1 exprimieren, wurden sie zusätzlich mit Orai1 transfiziert. Ein Teil der CHO_{WT}-Zellen wurde

vor der Lyse zusätzlich mit Tunicamycin (Tun) behandelt, das durch Inhibierung von N-Acetylglucosamin-Phosphotransferasen bereits den ersten Schritt der Glykosylierung hemmt (s. Abb. 4).

Alle drei Proben ließen im Westernblot bei Detektion mit α -Orail eine Doppelbande bei ~ 35 - 37 kDa erkennen. Beide CHO_{WT}-Proben zeigten zudem mehrere Banden bei ~ 50 kDa, die in CHO_{Lec}-Zellen nicht detektiert werden konnten und bei Behandlung mit Tunicamycin auch in CHO_{WT}-Zellen deutlich reduziert wurden (~ 80 %). Bei Detektion von STIM1 waren für das Molekulargewicht des detektierten Proteins keine Unterschiede zwischen CHO_{WT}, CHO_{Lec} und Tunicamycin-behandelten CHO_{WT}-Zellen nachweisbar (s. Abb. 13B).

Bei verstärkter Auftrennung der höhermolekularen Banden war zu erkennen, dass auch in CHO_{Lec}-Zellen synthetisiertes STIM1 ein geringfügig geringeres Molekulargewicht aufwies, als in CHO_{WT}-Zellen synthetisiertes STIM1 (s. Abb. 13C).

Neben der intrazellulären Hemmung der Glykosylierung in Transferase-defizienten Zellen, durch Tunicamycin oder Mutieren der Glykosylierungs-Stelle, können N-glykosidisch verknüpfte Glykane von einem Protein auch nach Zelllyse mittels Inkubation mit der Peptide-N-Glykosidase F (PNGase F) entfernt werden [Tarentino et al., 1985]. Diese schneidet zwischen dem ersten Zuckerrest des angehängten Glykans und dem verknüpften Asparagin-Rest des glykosylierten Proteins und trennt somit Glykan und Protein voneinander.

Die Detektion mit α -Orail in Westernblots aus unbehandelten Jurkat T-Zell-Lysaten zeigte mehrere Banden für Orail im Bereich um 50 kDa sowie eine Doppelbande knapp unter 37 kDa. Nach PNGase-Behandlung der Lysate reduzierten sich alle detektierbaren Banden auf die Doppelbande knapp unter 37 kDa (s. Abb. 13D).

Dass es sich bei der Vielzahl der Banden, die mit α -Orail in Jurkat-T-Zellen detektiert wurden, um eine spezifische Bindung des Antikörpers handelt, konnte auch mit Hilfe von siRNA gegen Orail gezeigt werden. Dabei war im Vergleich mit *non-silencing*-siRNA (ns-siRNA) -transfizierten Zellen (ns) sowohl 24 h wie auch 48 h nach Transfektion mit Orail-siRNA im Westernblot eine deutliche Reduktion der Bandenintensität aller mit α -Orail detektierbaren Banden zu sehen (s. Abb. 13E).

Wird Orail aus dem wildtypischen Gen in unbehandelten, unmodifizierten Zellen synthetisiert, liegt das Protein mit unterschiedlichen Molekulargewichten zwischen ~ 35 - 70 kDa vor. Eine Unterbindung der Glykosylierung oder die Deglykosylierung reduziert die detektierbaren Molekulargewichtvarianten von Orail auf ein oder zwei Varianten mit ~ 35 kDa. Dies lässt den Schluss zu, dass die Anzahl der detektierbaren Molekulargewichtvarianten abhängig von der Art der Expression (endogen, exogen) und dem verwendeten Zellsystem ist.

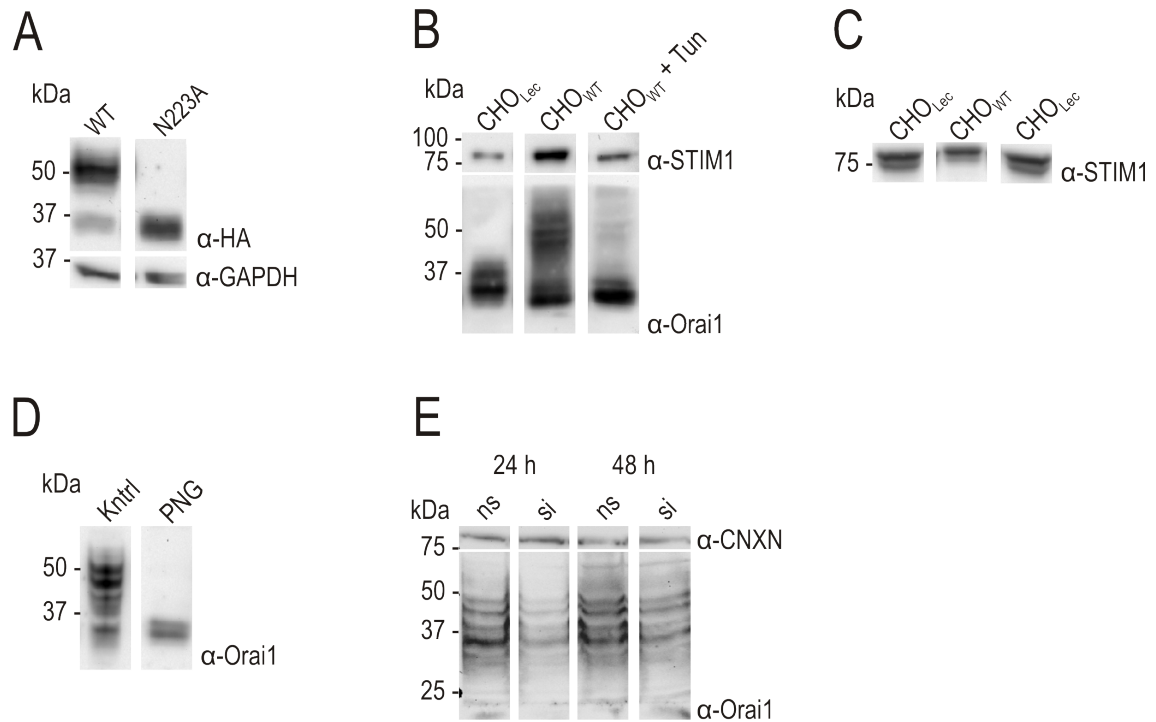


Abbildung 13: **Die Glykosylierung von Orai1.** **A:** HA-Orai1_{WT} (WT) bzw. HA-Orai1_{N223A} (N223A) stabil exprimierende Jurkat-T-Zellen wurden lysiert, lysierte Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung geblottet und mittels α -HA und α -GAPDH detektiert. **B:** CHO_{WT}-Zellen (CHO_{WT}) bzw. CHO_{Lec}-Zellen (CHO_{Lec}) wurden unbehandelt/nach Tunicamycinbehandlung (CHO_{WT}+Tun) lysiert, lysierte Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung geblottet und mittels α -Orai1 (Anaspec) und α -STIM1 detektiert. **C:** Die gleichen Zellen wie in A wurden lysiert, lysierte Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung (6 % Trenngel) geblottet und mittels α -STIM1 detektiert. **D:** Jurkat-T-Zellen wurden lysiert, falls angegeben mit PNGase F (PNG) bzw. Kontrolllösung (Kntnl) behandelt, lysierte Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung geblottet und mittels α -Orai1 (Sigma) detektiert. **E:** Jurkat-T-Zellen wurden 24 h bzw. 48 h nach Transfektion mit siRNA gegen Orai1-3'UTR (si) bzw. ns-siRNA (ns) lysiert, lysierte Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung geblottet und mittels α -Orai1 (Sigma) und α -Calnexin (α -CNXN) detektiert.

4.2 Der Einfluss einer Deglykosylierung auf SOCE und I_{CRAC}

Um mögliche modulatorische Funktionen der Glykosylierung aufzudecken, wurden verschiedene Zelltypen bzw. -linien mit Tunicamycin behandelt und der speicheraktivierte Ca^{2+} -Einstrom mittels Fura-2 AM basierten Ca^{2+} -Imaging-Messungen 24 h Stunden nach Applikation aufgezeichnet.

Während bei primären T-Zellen generell eine signifikante Verstärkung der Einstromrate zu detektieren war (mit zusätzlich verstärktem Effekt in stimulierten verglichen mit naiven CD4-Zellen), variierte der Effekt von Tunicamycin auf die Einstromrate in Tumorzelllinien.

Dabei konnte in HMC1.2-Mastzellen eine signifikante Verstärkung der Einstromrate gemessen werden, während in SKMEL5-Melanomazellen eine signifikante Reduktion und in WM3734-Melanomazellen kein signifikanter Einfluss auf die Einstromrate zu detektieren war (s. Abb. 14F).

Der maximale, relative Ratio-Wert (rel. Ratio-Peak) nach Speicherentleerung war nur in naiven CD4-Zellen signifikant erhöht (s. Abb. 14G), während in allen anderen Zelltypen und Tumorzelllinien kein signifikanter Effekt auf den relativen Ratio-Peak zu detektieren war.

Eine Erhöhung des relativen Ratio-Plateau war hingegen nur bei den Tumorzelllinien detektierbar (s. Abb. 14H), ohne dass sich ein signifikanter Einfluss in primären Zellen zeigen ließ.

Wegen des signifikanten Einflusses, den das STIM1/Orai1-Verhältnis auf die Aktivierung des Kanals hat [Scrimgeour et al., 2009] [Hoover and Lewis, 2011], wurde die Expression von Orai1 und STIM1 auch mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene bestimmt. Dabei zeigten CD4-Zellen und Jurkat-T-Zellen ($STIM1/Orai1 > 1,5$) im Gegensatz zu HMC1.2-Mastzellen ($STIM1/Orai1 < 0,5$) eine deutlich höhere Expression von STIM1 im Vergleich zu Orai1 (s. Abb. 15A-B). Betrachtet man auch den signifikant verstärkenden Effekt von Tunicamycin auf Jurkat-T-Zellen ($p < 0,001$) [Kilch, 2012], so zeigten die Zelltypen, für die ein höheres STIM1/Orai1 Verhältnis nachgewiesen werden konnte, einen signifikanteren Einfluss von Tunicamycin auf die Rate des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms (Jurkat $>$ CD4 $>$ HMC1.2).

Der funktionelle Effekt der Deglykosylierung mit Tunicamycin auf SOCE ist zelltyp-abhängig. Tendenziell scheint die Behandlung aber eine verstärkende Wirkung auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom zu haben, wobei der Einfluss von Tunicamycin auf die Einstromrate auch mit dem STIM1/Orai1-Verhältnis korreliert.

4.3 Charakterisierung der Glykosylierung von Orai1

Um zu klären, ob die unterschiedlich hohen, absoluten Amplituden von SOCE in den einzelnen Zelltypen bzw. -linien durch eine unterschiedliche Glykosylierung von Orai1 bedingt sein könnten, wurde zunächst untersucht, wie und ob sich die relativen Molekülmassen von Orai1 in den Zelltypen bzw. -linien unterscheiden.

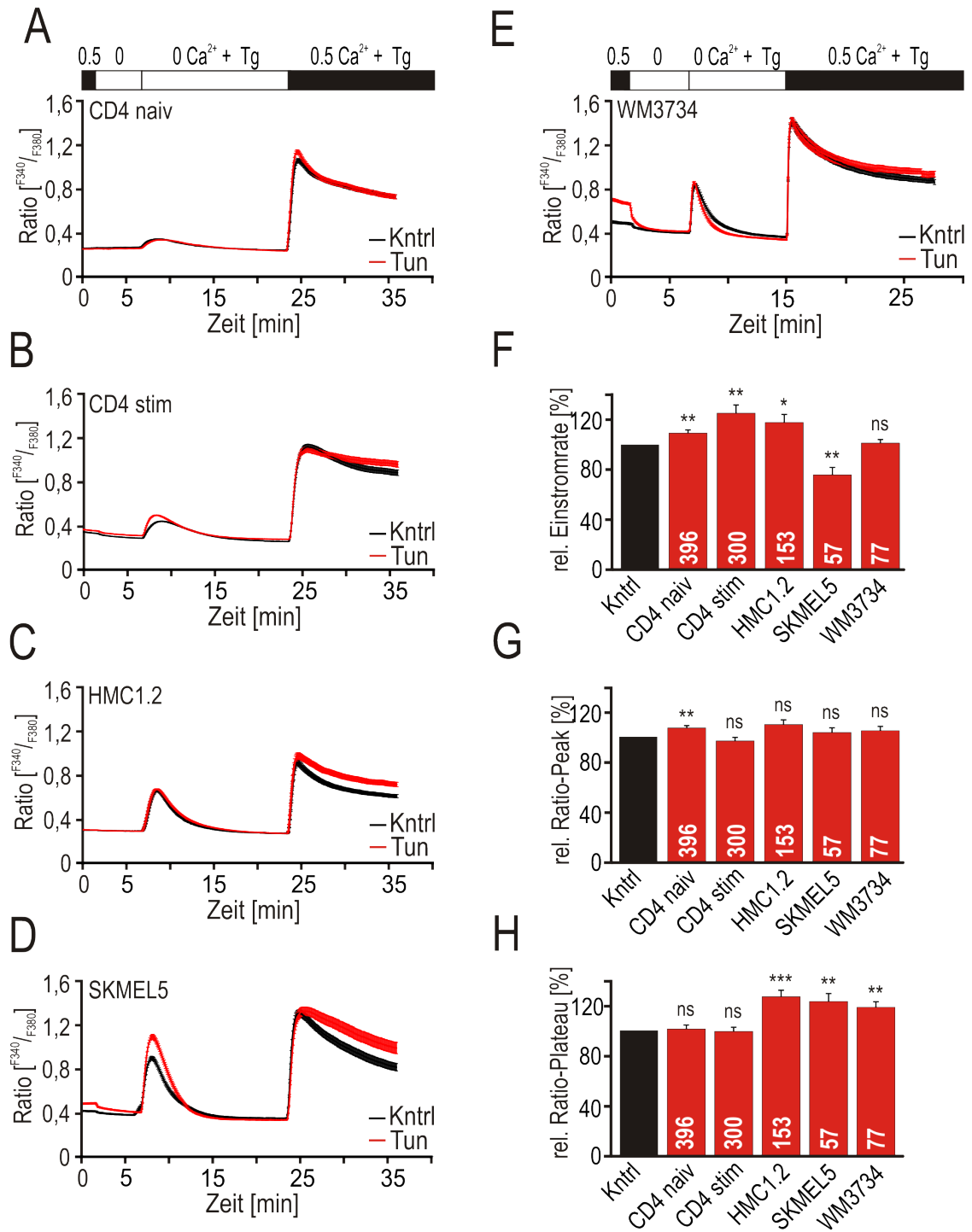


Abbildung 14: **SOCE nach Deglykosylierung mit Tunicamycin.** Die angegebenen Zelltypen bzw. -linien wurden 24 h vor der Messung mit 3 µg/ml Tunicamycin (Tun; rot) bzw. DMSO (Kntrl; schwarz) behandelt. Die Messung von SOCE erfolgte nach dem Ca^{2+} -Readdition-Protokoll. **A-E:** Zeitlicher Verlauf des mittleren Ratio $[\text{F}_{340}/\text{F}_{380}]$ als Maß für die freie, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bei Perfusion gemäß der angegebenen Protokolle in A für CD4-, HMC1.2- und SKMEL5- sowie in E für WM3734-Zellen. Für **F:** Einstromrate **G:** Ratio-Peak und **H:** Ratio-Plateau, wurden die relativen prozentualen Unterschiede der Tunicamycin-behandelten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen (Kntrl) ermittelt. Die Anzahl der ausgewerteten Zellen ist für den jeweiligen Zelltyp angegeben.

Dabei konnten mit dem Orai1-spezifischen Antikörper (α -Orai1; Sigma) abhängig von der untersuchten Zelllinie im Westernblot eine Vielzahl von Produkten mit einem Molekulargewicht um die 50 und 30 kDa detektiert werden (s. Abb. 15C).

Um die Spezifität des Antikörpers nachzuweisen und um zu zeigen, dass es sich bei den detektierten Banden um verschieden glykosylierte Produkte von Orai1 handelt, wurden einzelne Lysate mit PNGase F behandelt und neben der jeweils unbehandelten Kontrolle aufgetragen. Bei Detektion im Westernblot konnte man erkennen, dass durch die enzymatische Behandlung alle mit α -Orai1 nachgewiesenen höhermolekularen Banden auf eine (SKMEL5/WM3734) bis zwei Banden (HMC1.2) bei ~ 33 kDa und eine Bande bei ~ 25 kDa reduziert wurden (s. Abb. 15D).

Die Synthese von Orai1 führt zu einer Vielzahl von Produkten mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Dabei variiert die Verteilung der relativen Anzahl und Größe der einzelnen Produkte zelltypspezifisch. Nach Deglykosylierung lässt sich Orai1 in allen Zelltypen nur noch als Einzel- bzw Doppelbande mit einem Molekulargewicht von ~ 33 kDa detektieren. Zusätzlich tritt nach der Deglykosylierung ein weiteres Orai1-Produkt von etwa ~ 25 kDa auf.

4.3.1 Quantifizierung der Tunicamycin-bedingten Deglykosylierung auf Proteinebene

Um die Wirkung von Tunicamycin auf die Glykosylierung von Orai1 isoliert aus verschiedenen Zelltypen bzw. -linien quantitativ und qualitativ vergleichen zu können, wurden drei verschiedenen Zelltypen bzw. -linien mit Tunicamycin (Tun) bzw. DMSO (Kntrl) behandelt und Lysat-Proben gleicher Proteinkonzentration nach Westernblot und Detektion mit α -Orai1 densitometrisch vermessen.

Betrachtet man die Intensität der Banden mit und ohne Tunicamycinbehandlung, so kam es nur bei den getesteten Tumorzelllinien, nicht aber bei naiven CD4-Zellen zu einer Reduktion der Bandenintensität zwischen 37 und 50 kDa (glykosylierte Form) und einer Zunahme der Bandenintensität der Banden <37 kDa (unglykosylierte Form) (s. Abb. 15E-H). Um bei primären CD4-Zellen eine Abnahme der Bandenintensität zwischen 37 und 50 kDa zu detektieren, mussten die Zellen mindestens 48 h mit Tunicamycin inkubiert werden (s. Abb. 15H; Blot nicht gezeigt).

Beim Vergleich der Änderungen der Bandenintensitäten und der Imaging-Daten gemessen in den verschiedenen Zelltypen bzw. -linien mit und ohne Tunicamycinbehandlung, war kein Zusammenhang zwischen der Quantität der Tunicamycin-bedingten Deglykosylierung (Abnahme der Menge an glykosyliertem Orai1) und dem Einfluss der Tunicamycin-bedingten Deglykosylierung auf SOCE (funktioneller Effekt) erkennbar.

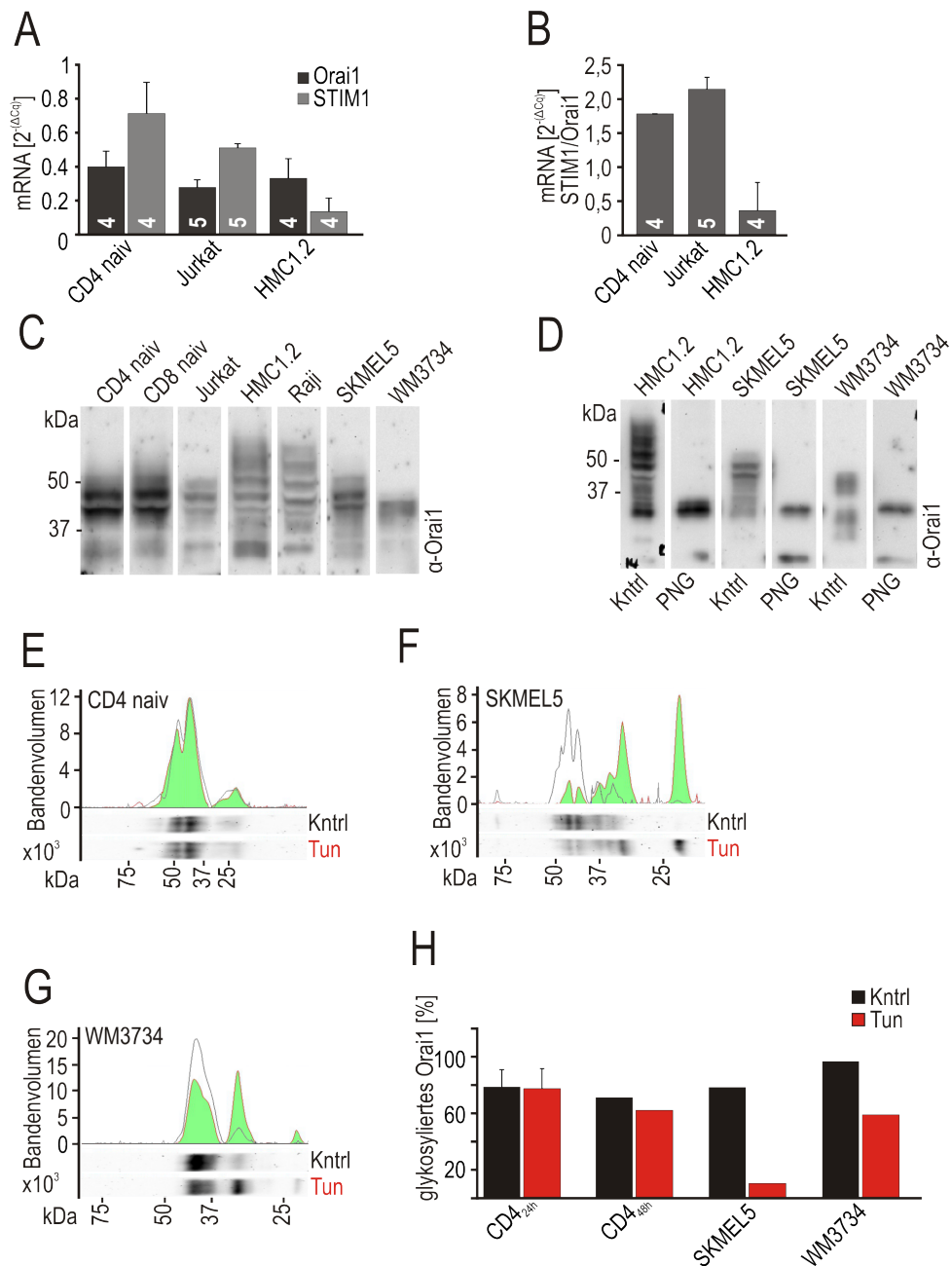


Abbildung 15: **Expression von Orai1 und STIM1, Charakterisierung der Glykosylierung und Visualisierung des Tunicamycin-Effektes.** **A:** mRNA-Level von Orai1 und STIM1 in den angegebenen Zelltypen bzw. -linien. Die Anzahl der getesteten Proben ist für den jeweiligen Zelltyp angegeben (durchgeführt von Gertrud Schwär). **B:** Aus den in A dargestellten 2^{-ΔCt}-Werten wurde der Quotient von STIM1 und Orai1 kalkuliert. **C:** Die angegebenen Zelltypen bzw. -linien wurden lysiert und falls angegeben mit PNGase F (PNG) behandelt. Lysierte Proteine wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung geblottet und mittels α-Orai1 (Sigma) detektiert. **E:** Naive CD4-Zellen, **F:** SKMEL5-Zellen und **G:** WM3734-Zellen wurden lysiert und falls angegeben mit Tunicamycin (Tun) behandelt. Lysierte Proteine wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung geblottet und mittels α-Orai1 (Sigma) detektiert. Die jeweilige Bandendichte wurde bestimmt und graphisch dargestellt (weiß: Kontrolle; grün: mit Tunicamycinbehandlung). **H:** Die angegebenen Zelltypen bzw. -linien wurden wie in E-G analysiert. Naive CD4-Zellen wurden zusätzlich für 48 h mit Tun behandelt. Der Anteil von glykosyliertem Orai1 (37kDa – 50 kDa) in Kontrolle (Kntrl; schwarz) und Tunicamycin-behandelten Zellen (Tun; rot) wurde ermittelt und graphisch dargestellt.

4.4 Die Sialylierung von Orai1

Die Verwendung von Lektinen in der Glykan-Analyse ist weitverbreitet, da ihre Spezifität für ganz bestimmte Glykan-Motive es ermöglicht, zwischen der Vielzahl von Glykan-Strukturen zu unterscheiden, während ihre Multivalenz gleichzeitig eine hochaffine Bindung an die Glykane bewirkt [Cummings and Etzler, 2009].

Lektine können an Säulenmaterial oder Agarose-*Beads* immobilisiert werden und ermöglichen so die einfache Aufreinigung von Glykoproteinen mit bestimmten Glykan-Motiven aus Lysaten. Sofern das entsprechende Glykan-Motiv Teil der Glykosylierung eines Proteins ist, wird das Protein an der Säule bzw. den *Beads* retiniert und befindet sich nach Aufreinigung im Eluat. Ist das Glykan-Motiv nicht vorhanden, wird das Protein nicht retiniert und lässt sich später im Durchfluss detektieren.

Zur Charakterisierung der Glykosylierung von Orai1 wurde HA-Orai1 aus HA-Orai1_{WT} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen eingesetzt und die entsprechenden Lysate zunächst einmal über verschiedene Lektin-Säulen aufgereinigt, deren Spezifität in Tabelle 46 aufgelistet ist. Die Retention gibt dabei eine Auskunft über vorhandene Glykan-Motive.

Tabelle 46: **Verwendete Lektine zur Charakterisierung der Glykosylierung von Orai1** unter Angabe der Abkürzung (Abk.), dem vollständigen Namen und Bindemotif (GlcNAc = N-Acetylglucosamin, Neu5Ac = N-Acetylneuraminsäure, GalNAc = N-Acetylgalactosamin, Glc = Glucose, Gal = Galactose, Sia = Sialylsäure) *erkennt in geringerem Maß auch α -2-3-Verknüpfungen. Literatur: WGA: [Peters et al., 1979], SNA: [Shibuyas et al., 1987], MAL: [Knibbsso et al., 1991], MAH: [Geisler and Jarvis, 2011]

Abk.	Name	Bindemotif
WGA	Wheat Germ agglutinin	GlcNAc β -1-4GlcNAc β -1-4GlcNAc, Neu5Ac
SNA	Sambucus nigra agglutinin	Neu5Ac α -2-6Gal(NAc)-R*
MAL	Maackia amurensis leuagglutinin	Neu5Ac/Glc α -2-3Gal β -1-4GlcNAc β -1-R
MAH	Maackia amurensis hemagglutinin	Neu5Ac/Glc α -2-3Gal β -1-3(Sia α -2-6)GalNAc-R

Während GAPDH und STIM1 an keiner der drei Säulen retinierten, retinierte Orai1 sowohl an der MAL- und SNA- wie auch an der WGA-Säule (s. Abb. 16A), wobei die höchste relative Retention von Orai1 an der WGA-Säule erfolgte (s. Abb. 16B).

Um auszuschließen, dass Orai1 auch über komplexe O-Glykosylierungen mit endständigen Sialyl-Resten verfügt (diese würden auch an WGA binden) wurden zur Differenzierung Retinierungsversuche mit SNA- und MAH- gekoppelten Agarose-*Beads* durchgeführt. Im Gegensatz zu MAL, das an α -2-3-gekoppelte Sialylsäuren von N-glykosidisch verknüpften Glykanen bindet, bindet MAH an α -2-3-gekoppelte Sialylsäuren von O-glykosidisch verknüpften Glykanen, während SNA die höchste Affinität für α -2-6- und eine geringere

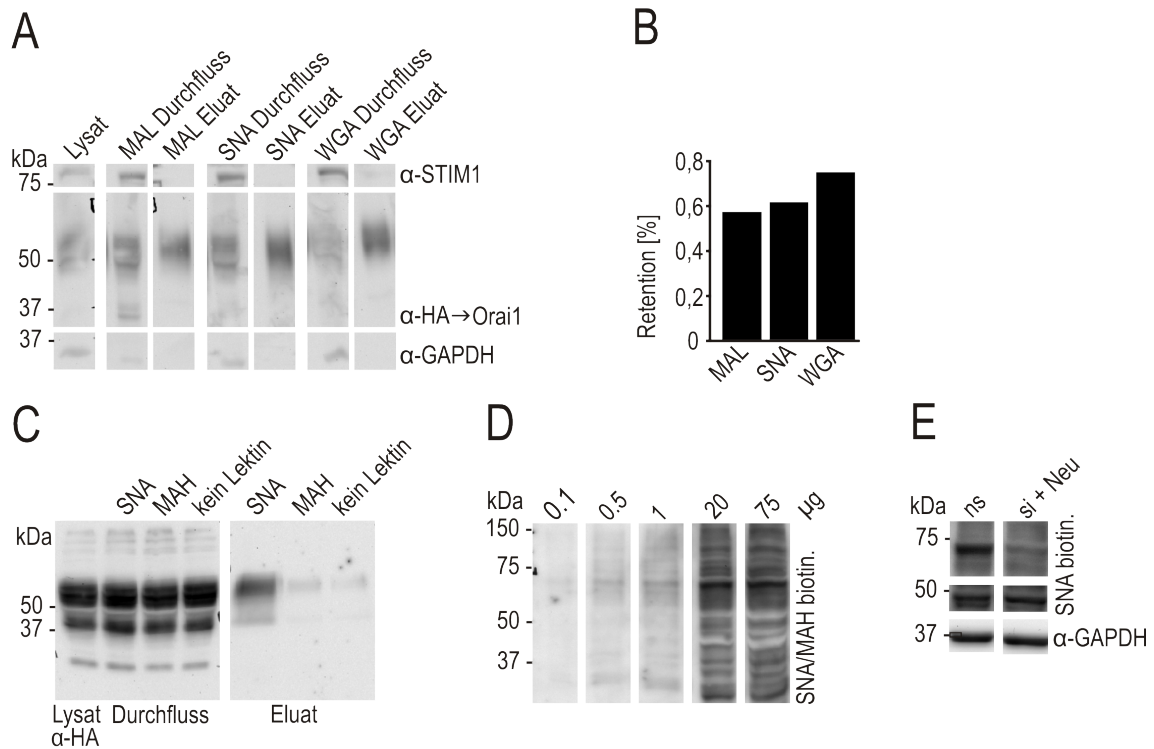


Abbildung 16: Charakterisierung mit Lektinen I. **A:** HA-Orai1_{WT} stabil exprimierende Jurkat-T-Zellen wurden lysiert, die lysierten Proteine mittels QProteome Glycoprotein Sialic Acid Kit (Qiagen) aufgereinigt (10^7 Zellen pro Säule), Durchfluss und Eluat der einzelnen Säulen (MAL, SNA oder WGA) gefällt, nach Rekonstituierung gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mittels α -STIM1, α -HA und α -GAPDH detektiert. **B:** Nach densitometrischer Auswertung der Banden in A wurde der prozentuale Anteil von HA-Orai1 in der Eluat-Fraktion am HA-Orai1-Gesamtprotein berechnet und als prozentuale Retention graphisch dargestellt. **C:** HA-Orai1_{WT} stabil exprimierende Jurkat-T-Zellen wurden lysiert, die lysierten Proteine über selbstgekoppelte Lektin-Beads (SNA/MAH) bzw. ungekoppelte Beads (kein Lektin) aufgereinigt, Lysat, Durchfluss und Eluat gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mittels α -HA detektiert. **D:** HA-Orai1_{WT} stabil exprimierende Jurkat-T-Zellen wurden lysiert, die lysierten Proteine in der angegebenen Menge gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mittels biotinylierter Lektine (SNA/MAH) und Avidin-HRP sowie α -GAPDH detektiert (Eastern-Blot). **E:** 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen ST3Gal1, ST3Gal4, ST3Gal6 und ST6Gal1 wurden HA-Orai1_{WT} stabil exprimierende Jurkat-T-Zellen für 30 min mit Neuraminidasen behandelt (si + Neu), wie in D aufgetrennt, geblottet und mit biotinyliertem SNA und Avidin-HRP detektiert. Als Kontrolle wurden mit ns-siRNA transfizierte, unbehandelte Zellen der gleichen Auftrennung und Detektion unterzogen (ns).

Affinität für α -2-3-gekoppelte Sialylsäuren von N-glykosidisch verknüpften Glykanen hat [Geisler and Jarvis, 2011].

Auch bei Retinierungsversuchen mit selbstgeköpkelten SNA- und MAH-*Beads* retinierte Orai1 nur an SNA (s. Abb. 16C). Da zu Gunsten eines detektierbaren Signals im Eluat die *Beads* mit Proteinlysate übersättigt wurden, ermöglicht der Versuch lediglich eine qualitative Aussage über die Affinität der einzelnen Lektine für Orai1.

Analog zur Verwendung von Antikörpern bei der Detektion von Proteinen im Westernblot können auch Lektine eingesetzt werden, um nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf eine Membran dort Proteine mit einer spezifischen Glykosylierung zu binden. Sind die Lektine biotinyliert, so können sie nach Bindung an die geblotteten Proteine mit HRP-gekoppeltem Avidin detektiert werden (Eastern-Blot).

Ziel der folgenden Versuche war die Detektion von gelelektrophoretisch aufgetrenntem und geblottetem Orai1-Protein mit biotinylierten Lektinen. Durch den Vergleich mit einem entsprechenden Westernblot sollte so die Art der Glykosylierung in den einzelnen Orai1-Produktbanden beurteilt werden.

Dazu wurden zunächst Ganzzell-Lysate steigender Proteinmenge aufgetragen und durch Detektion mit biotinyliertem SNA/MAH eine Vielzahl von sialylierten Glykoproteinen in Jurkat-T-Zellen nachgewiesen (s. Abb. 16D).

Um die Spezifität des biotinylierten SNA für sialylierte Proteine zu zeigen, wurden Jurkat-T-Zellen mit siRNA gegen ST3GAL1, ST3Gal4, ST3Gal6 und ST6Gal1 transfiziert sowie kurz vor der Ernte mit Neuraminidasen (si + Neu) behandelt. Bei Detektion mit biotinyliertem SNA war in der siRNA-/ Neuraminidase-behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten ns-siRNA-transfizierten Kontrolle (ns) eine deutliche Reduktion der prominentesten Banden zu erkennen (s. Abb. 16E). Auf eine Quantifizierung und Wiederholung des Versuches wurde verzichtet, da die GAPDH-Kontrolle eindeutig eine vergleichbar hohe Proteinkonzentration in beiden Proben zeigte und der Versuch nur dem Nachweis der Effizienz der Desialylierung wie auch der Detektion mit biotinyliertem SNA dienen sollte.

Für den spezifischen Nachweis der Sialylierung von Orai1 wurde HA-Orai1 aus stabil HA-Orai1_{WT} bzw. HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen über α -HA-Agarose aufkonzentriert und die sialylierten Proteine in Überstand und Eluat detektiert.

Dabei ließ sich die Sialylierung in Westernblots mit aufkonzentriertem Orai1-Protein nicht direkt nachweisen (s. Abb. 17A). Zur sensitiveren Detektion wurde für die folgenden Experimente sialyliertes Protein über SNA-*Beads* aufkonzentriert und für die Detektion ein spezifischer Antikörper verwendet (α -HA oder α -Orai1).

4.4.1 Die Rolle von ST6Gal1

Um die spezifische Sialylierung durch ST6Gal1 zu zeigen, wurden die stabil HA-Orai1_{WT} exprimierenden Jurkat-T-Zellen zunächst mit siRNA gegen ST6Gal1 (si) oder ns-siRNA (ns) transfiziert. Anschließend wurde lysiertes Protein an SNA-*beads* retiniert und HA-Orai1 nach Auftrennung und Blotten von Eluat und Durchfluss im Westernblot mit α -HA

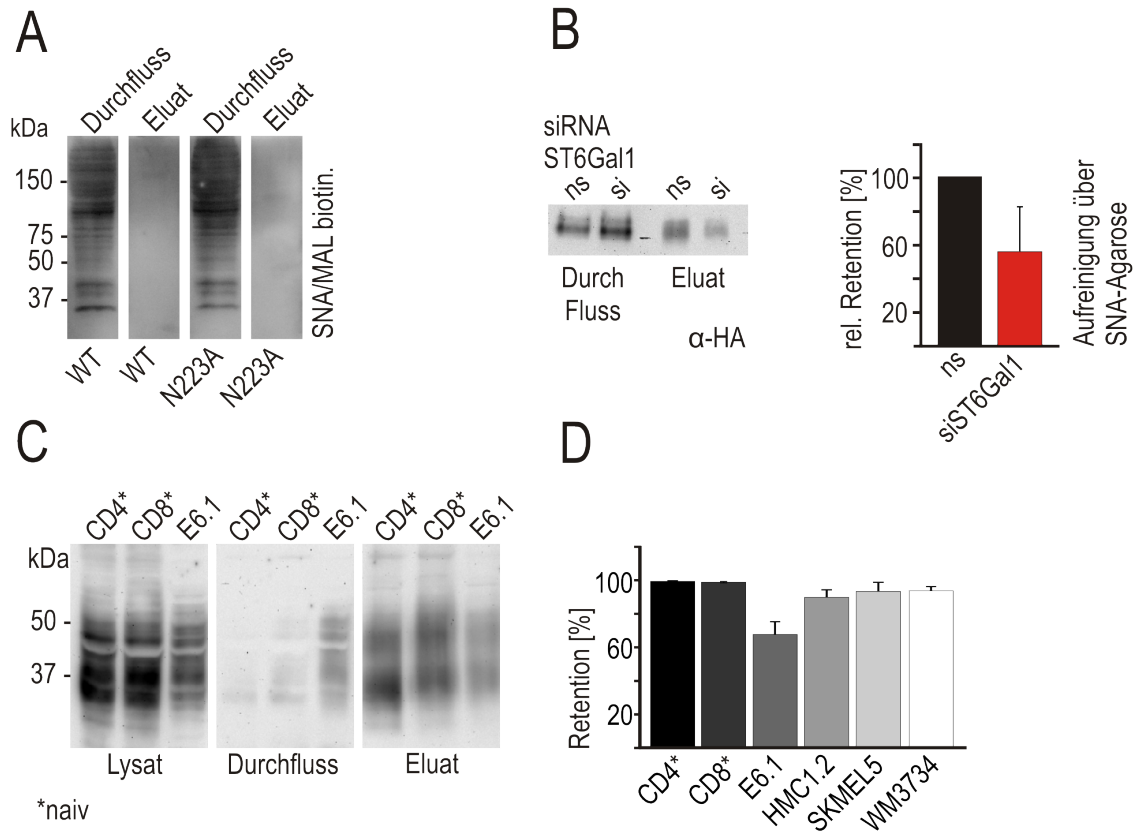


Abbildung 17: **Charakterisierung mit Lektinen II.** **A:** HA-Orai1_{WT} (WT) bzw. HA-Orai1_{N223A} (N223A) stabil exprimierende Jurkat-T-Zellen wurden lysiert, über α-HA-gekoppelte Agarose aufgereinigt, die Proteine der entsprechenden Fraktionen elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mittels biotinylierter Lektine (SNA/MAH) und Avidin-HRP detektiert (Easternblot). **B:** HA-Orai1_{WT} stabil exprimierende Jurkat-T-Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit ST6Gal1-siRNA (siST6Gal1; rot) bzw. ns-siRNA (ns; schwarz) lysiert und über SNA-Beads aufgereinigt. Die Proteine der entsprechenden Fraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mittels α-HA detektiert. Nach densitometrischer Auswertung wurde der prozentuale Anteil von HA-Orai1 in der Eluat-Fraktion am HA-Orai1-Gesamtprotein berechnet, auf die ns-Kontrolle normiert, für alle Messungen gemittelt und als relative prozentuale Retention graphisch dargestellt (n=3). Aufgrund der notwendigen Normierung konnte die Signifikanz nicht überprüft werden. **C-D:** Die angegebenen Zelltypen bzw. -linien wurden nach Lyse über SNA-Beads aufgereinigt, die Proteine der entsprechenden Fraktionen elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mittels α-HA detektiert. **C:** Exemplarischer Westernblot. **D:** Nach densitometrischer Auswertung wurde der prozentuale Anteil von HA-Orai1 in der Durchfluss-Fraktion am HA-Orai1-Gesamtprotein berechnet. Die Retention wurde kalkuliert und für alle Messungen gemittelt, graphisch dargestellt (n=4).

detektiert. Die Bandendichte wurde densitometrisch bestimmt.

Dabei konnte bei Aufreinigung ST6Gal1-siRNA-transfizierter Zellen (siST6Gal1) im Vergleich zu ns-siRNA-transfizierten Zellen (ns) weniger Orai1-Protein im Eluat detektiert werden. Die reduzierte Expression von ST6Gal1 führte also zu einer Abnahme der Bindungsaffinität von Orai1 für SNA-*Beads* (s. Abb. 17B).

Wie gezeigt werden konnte, ist der direkte Nachweis von glykosylierten Proteinen mit biotinyliertem SNA möglich, funktionierte aber nicht für Orai1. Die Bindung von Orai1 an SNA-Lektine konnte mit SNA-*Beads* gezeigt werden, wobei die Herunterregulation von ST6Gal1 die Bindungsaffinität von Orai1 für SNA verringert.

4.4.2 Die Sialylierung in verschiedenen Zelltypen

Um eine quantitative Aussage bezüglich der Sialylierung von Orai1 in verschiedenen Zelllinien und im Vergleich zu primären Immunzellen zu treffen, wurden Lysate verschiedener Zellen unter gleichen Bedingungen mit SNA-*Beads* inkubiert und nach Aufreinigung und Detektion mit α -Orai1 sowie densitometrischer Bestimmung die relative Proteinmenge in der Durchfluss-Fraktion relativ zur Lysat-Fraktion bestimmt.

Dabei war zu erkennen, dass Orai1 aus Jurkat-T-Zellen eine deutlich geringere Affinität zu SNA-*Beads* aufwies, als Orai1 aus naiven CD4- oder CD8-Zellen. Die Affinität von Orai1 aus den getesteten Tumorzelllinien HMC1.2, SKMEL5 und WM3734 für SNA lag zwischen der von Jurkat-T-Zellen und naiven T-Zellen (s. Abb. 17C-D).

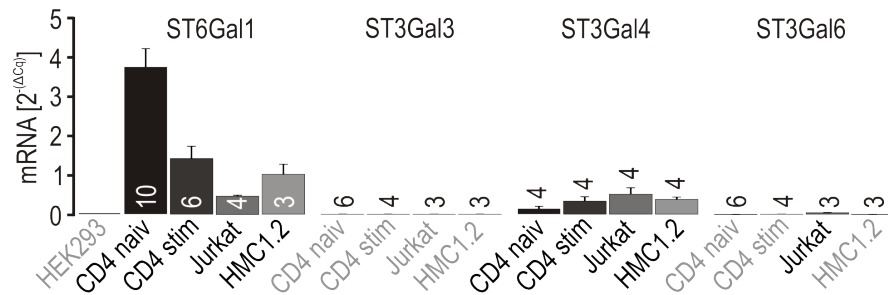
Zusätzlich wurde die Expression aller Sialyltransferasen untersucht, die an der N-Glykosylierung beteiligt sind und deren Expression in Lymphozyten bereits in der Literatur gezeigt wurde (durchgeführt von Gertrud Schwär).

In allen getesteten Zelllinien und primären T-Zellen wurden nur ST6Gal1 und ST3Gal4 in nennenswertem Maße exprimiert. Während primäre T-Zellen einen höheren mRNA-Gehalt von ST6Gal1 als von ST3Gal4 zeigten (naive CD4: 30x höher; stimulierte CD4: 4x höher), lag der mRNA-Gehalt für die α -2-6-verknüpfende ST6Gal1 und die α -2-3-verknüpfende ST3Gal4 in Jurkat-T-Zellen und HMC1.2-Mastzellen etwa auf dem gleichen Niveau. Im Vergleich zu unstimulierten Zellen war der mRNA-Gehalt von ST6Gal1 in den stimulierten Zellen etwa 60 % niedriger (s. Abb. 18A).

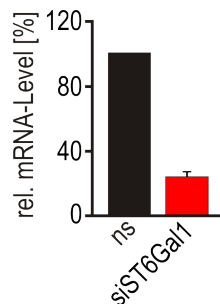
4.4.3 Der funktionelle Einfluss von ST6Gal1

Wegen der vergleichsweise hohen Expression von ST6Gal1 in primären Zellen (s. Abb. 18A) wurde der Einfluss von ST6Gal1-gerichteter siRNA auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom untersucht. Dazu wurden verschiedenen Zelltypen bzw. -linien mit siRNA gegen ST6Gal1 (siST6Gal1) bzw. ns-siRNA (ns) transfiziert und 24 h bzw. 48 h nach Transfektion der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom mittels Ca^{2+} -Imaging bestimmt. Die Effizienz der siRNA-vermittelten Herunterregulation von ST6Gal1 in Jurkat-T-Zellen wurde auf mRNA-Ebene und in CD4-Zellen auf Proteinebene ermittelt.

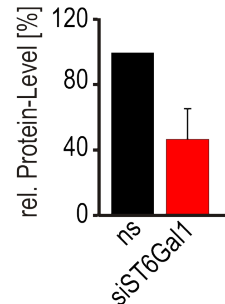
A



B



C



D

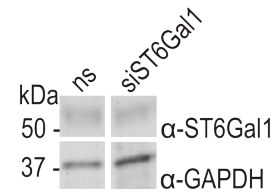


Abbildung 18: **Expression von ST6Gal1.** **A:** mRNA-Level von ST6Gal1, ST3Gal3, ST3Gal4 und ST3Gal6 in den entsprechenden Zelltypen bzw. -linien. Die Anzahl der getesteten Proben ist für den jeweiligen Zelltyp angegeben (durchgeführt von Gertrud Schwär). **B:** Mittleres, relatives mRNA-Level von ST6Gal1 in Jurkat-T-Zellen 48 h nach Transfektion mit siRNA gegen ST6Gal1 (siST6Gal1; rot) bzw. ns-siRNA (ns; schwarz) und Normierung auf die ns-Kontrolle (n=2). **C:** Naive CD4-Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit siRNA gegen ST6Gal1 (siST6Gal1; rot) bzw. ns-siRNA (ns; schwarz) lysiert, Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mittels α-ST6Gal1 und α-GAPDH detektiert. Nach densitometrischer Bestimmung der entsprechenden Banden und Berechnung des Quotienten aus ST6Gal1 und dem Haushaltsgen GAPDH wurden die Werte auf die ns-Kontrolle normiert und graphisch dargestellt (n=2). **D:** Exemplarischer Westernblot, der die Detektion von ST6Gal1 und GAPDH zeigt, die für die Auswertung in C verwendet wurde.

Auf mRNA-Ebene zeigte sich für ST6Gal1 nach Transfektion mit der entsprechenden siRNA eine Herunterregulation auf etwa 20 % (s. Abb. 18B). Auf Proteinebene war hingegen eine Reduktion auf etwa 40 % zu messen (Abb. 18C-D). Als Kontrollgruppe dienten hierbei Zellen, die mit ns-siRNA (ns) transfiziert worden waren.

Nach Validierung der siRNA-Effizienz, wurde der Einfluss der Herunterregulation von ST6Gal1 auf SOCE in verschiedenen Zelltypen bzw. -linien untersucht, wobei auch verschiedene Zeitabstände zwischen Transfektion und den Messungen von SOCE getestet wurden.

Beim Vergleich der einzelnen Bedingungen lies sich erkennen, dass die Herunterregulation von ST6Gal1 fast immer zu einer Zunahme von SOCE führte, was sich in den meisten getesteten Systemen sowohl in Einstromrate, Ratio-Peak sowie Ratio-Plateau zeigte.

Bei naiven CD8-Zellen war nach Herunterregulation von ST6Gal1 kein signifikanter Effekt auf SOCE zu detektieren, wobei die siRNA-Behandlung zu einer tendenziellen Erhöhung von Ratio-Peak und Plateau führte (s. Abb. 19A-B). In CD4-Zellen wurde der Ca^{2+} -Einstrom bei Herunterregulation von ST6Gal1 unter allen betrachteten Aspekten tendenziell erhöht. Eine signifikante Erhöhung zeigte sich bei naiven CD4-Zellen jedoch nur beim Ratio-Peak und -Plateau (s. Abb. 19C-D).

Während die Herunterregulation von ST6Gal1 in stimulierten CD4-Zellen 72 h nach Transfektion zu einer signifikanten Verstärkung der Einstromrate führte (s. Abb. 19G-H), war im gleichen Zelltyp 48 h nach Transfektion lediglich eine tendenzielle Verstärkung von Ratio-Peak und Plateau zu detektieren (s. Abb. 19E-F).

Vergleicht man die ST6Gal1-siRNA-bedingte Verstärkung von SOCE in naiven und stimulierten CD4-Zellen, verringerte sich die Signifikanz der Verstärkung bei Stimulation der Zellen in Bezug auf Ratio-Peak und -Plateau. Die verminderte Signifikanz der ST6Gal1-siRNA-bedingten Verstärkung stand dabei auch in Korrelation zum verringerten ST6Gal1-mRNA-Level in stimulierten CD4-Zellen verglichen mit naiven CD4-Zellen.

Jurkat-T-Zellen wurden wegen der schnelleren Proliferation auch 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen ST6Gal1 gemessen. Eine tendenzielle Steigerung der Einstromrate, sowie eine signifikante Steigerung von Ratio-Peak und -Plateau waren jedoch auch in der T-Zell-basierten Tumorzelllinie erst 48 h nach Transfektion messbar (s. Abb. 20A-D).

Um eine eventuelle Überdeckung der ST6Gal1-siRNA-bedingten Verstärkung von SOCE durch die Funktion redundanter Sialyltransferasen zu unterbinden, wurden Jurkat-T-Zellen zusätzlich mit einem siRNA-Mix gegen mehrere Sialyltransferasen behandelt (ST3Gal1, ST3Gal4, ST3Gal6 und ST6Gal1). Auch nach Transfektion mit dem siRNA-Mix zeigte sich eine signifikante Steigerung von Einstromrate und Ratio-Peak erst 48 h nach Transfektion (s. Abb. 20G-H), während 24 h nach Transfektion noch eine signifikante Verminderung von SOCE in Bezug auf Einstromrate und Ratio-Peak zu detektieren war (s. Abb. 20E-F).

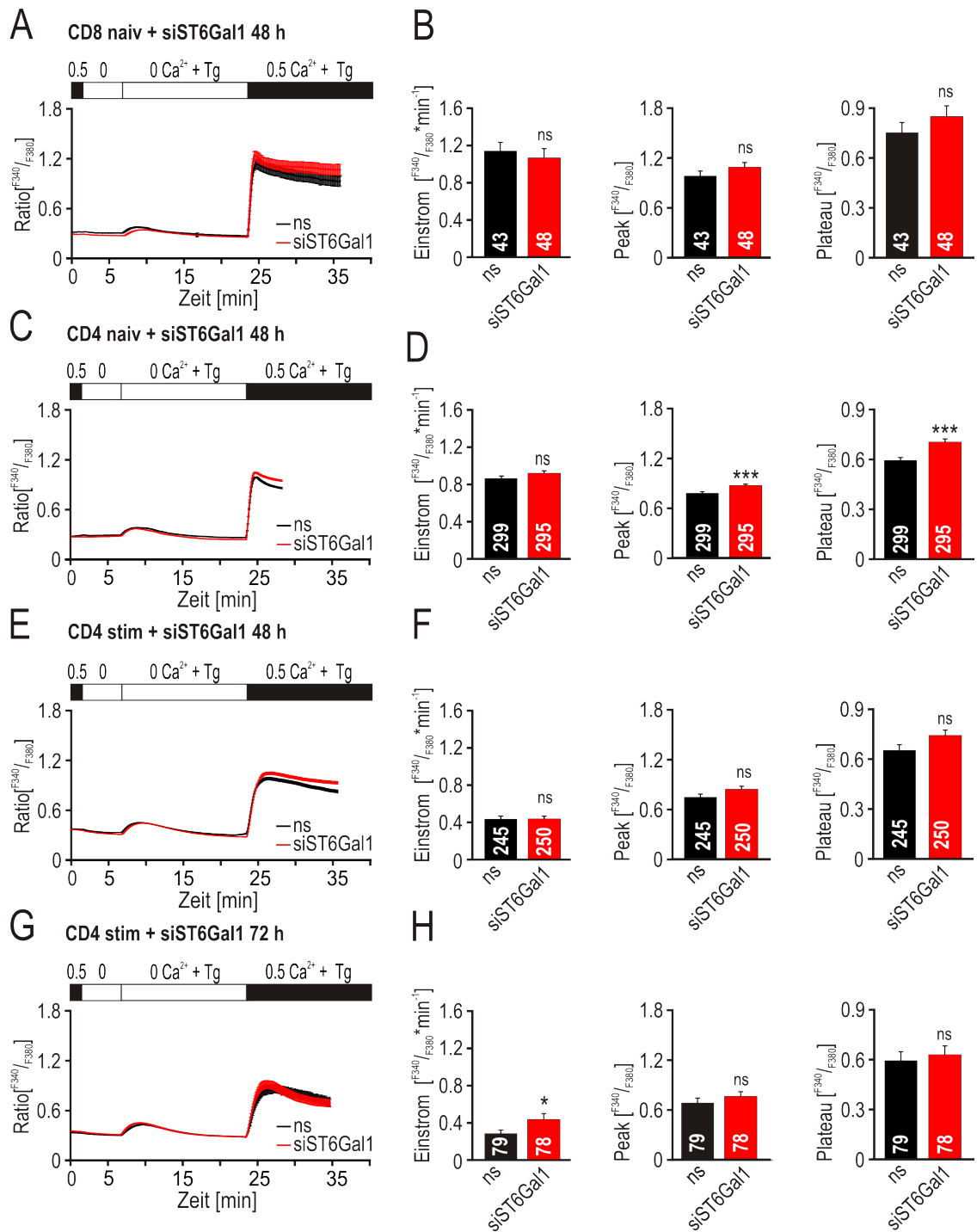


Abbildung 19: **SOCE nach Herunterregulation von ST6Gal1 in naiven T-Zellen.** A-H: Die angegebenen Subtypen wurden zum angegebenen Zeitpunkt vor der Messung mit siRNA gegen ST6Gal1 (siST6Gal1; rot) bzw. ns-siRNA (ns; schwarz) transfiziert, Änderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mittels Fura-2 AM bei Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin gemessen (Ca²⁺-Readdition-Protokoll) und der mittlere zeitliche Verlauf von Ratio [$F_{340}^{Ca^{2+}}/F_{380}$], die mittlere Einstromrate, Ratio-Peak und -Plateau kalkuliert. Die Anzahl der ausgewerteten Zellen pro Messung ist angegeben.

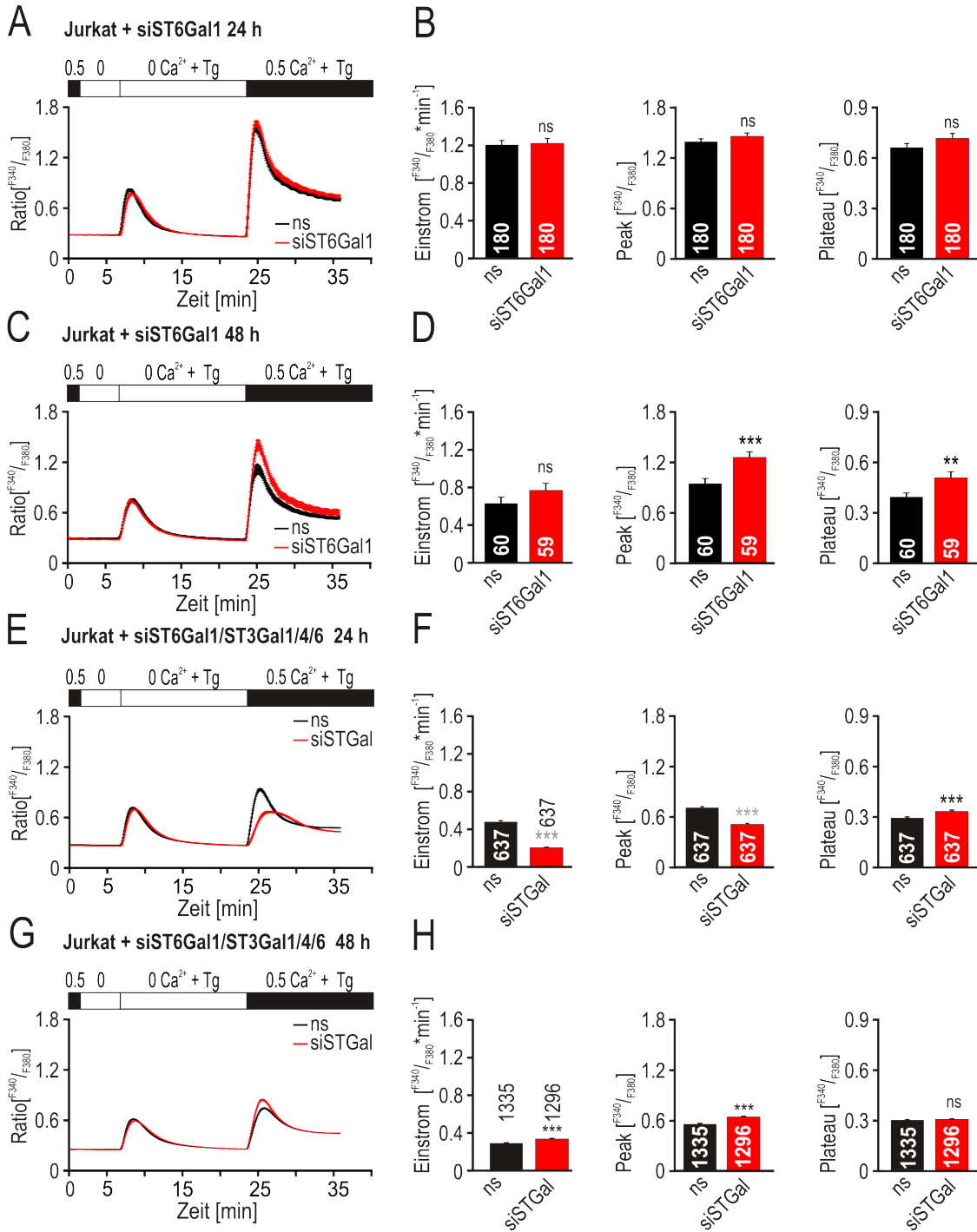


Abbildung 20: **SOCE nach Herunterregulation von ST6Gal1 und ST3Gal in Jurkat-T-Zellen.** A-H: Jurkat-T-Zellen wurden zum angegebenen Zeitpunkt vor der Messung mit siRNA gegen die angegebenen Sialyltransferasen (siSTGal; rot) bzw. ns-siRNA (ns; schwarz) transfiziert, Änderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mittels Fura-2 AM bei Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin gemessen (Ca²⁺-Readdition-Protokoll) und der mittlere zeitliche Verlauf von Ratio [$F_{340}^{Ca^{2+}}/F_{380}$], die mittlere Einstromrate, Ratio-Peak und -Plateau kalkuliert. Die Anzahl der ausgewerteten Zellen pro Messung ist angegeben.

4.4.4 Inhibition der Golgi-Mannosidase II und der Effekt auf SOCE

Neben siRNA zur Inhibierung verschiedener Glykosyltransferasen gibt es auch die Möglichkeit verschiedene Chemikalien zu nutzen, die bestimmte Schritte der Glykosylierung inhibieren. Dazu gehört auch Swainsonin, das die Biosynthese von komplexen Glykoproteinen durch Hemmung der Golgi-Mannosidase II [Tulsianis and Touster, 1983] inhibiert. *High-Mannose*-Glykoproteine können dadurch nicht weiter zu *Common-Core*-Glykoproteinen prozessiert werden.

Da die Effizienz der Swainsonin-Behandlung nicht wie die Herunterregulation von ST6Gal1 über qRT-PCR bestimmt werden kann, wurde eine alternative Möglichkeit entwickelt, die Wirkung der Swainsonin-Behandlung zu zeigen. Geblottete Ganzzell-Lysate wurden dazu mit biotinyliertem SNA behandelt und gebundenes SNA mit Avidin-HRP detektiert. Ein direkter Vergleich aller detektierten Proteine in den geblotteten Lysaten von Kontroll- und Swainsonin-behandelten Zellen zeigte allerdings keinen Unterschied (s. Abb. 21A).

Die Detektion mit Antikörpern zeigt eine höhere Empfindlichkeit, als die Detektion mit biotinylierten Lektinen. Daher wurden im nächsten Versuch sialylierte Proteine in den Lysaten von Kontrollgruppe und Swainsonin-behandelten Zellen erst über SNA-*Beads* aufkonzentriert und nach Westernblot mit einem Orai1-spezifischen Antikörper detektiert.

Bei desitometrischer Bestimmung der Bandendichte konnte im höhermolekularen Bereich (50-66 kDa) in den geblotteten Lysaten Swainsonin-behandelter Zellen eine ~ 15 %ige Reduktion verglichen mit den Kontrollzellen detektiert werden. Die Bandenintensität im mittleren Bereich (47 kDa) nahm dagegen um ~ 15 % zu. Die Bandenintensität im niedermolekularen Bereich (33-37 kDa) hatte sich in den geblotteten Lysaten Swainsonin-behandelter Zellen verglichen mit den Kontrollzellen nicht verändert (s. Abb. 21B-C). Da Swainsonin nur die komplexe Glykosylierung inhibiert, sollten von der Behandlung auch nur höhermolekulare Glykane betroffen sein. Die 15%ige Reduktion im Bereich von 50-66 kDa kann damit als Maßstab für die Effizienz der Swainsonin-Behandlung dienen.

Zur Beurteilung eines möglichen funktionellen Effektes wurde der Einfluss von Swainsonin auf SOCE in stimulierten CD4-Zellen nach Thapsigargin induzierter Speicherentleerung und in Jurkat-T-Zellen nach physiologischem Stimulus über den Kontakt mit α -CD3/ α -CD28-gekoppelten *Beads* bestimmt.

Auch beim Einfluss von Swainsonin war ein zelltypspezifischer Unterschied zu erkennen. Die Behandlung stimulierter CD4-Zellen führte bereits nach 24 h Inkubation mit 0,5 μ M Swainsonin zu einer signifikanten Steigerung der Einstromrate (s. Abb. 21D-E). Bei Jurkat-T-Zellen war auch nach 96 h Inkubation mit 11,5 μ M Swainsonin kein signifikanter Unterschied im speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom zwischen Swainsonin-behandelten Zellen und Kontrollzellen messbar (s. Abb. 21F-G).

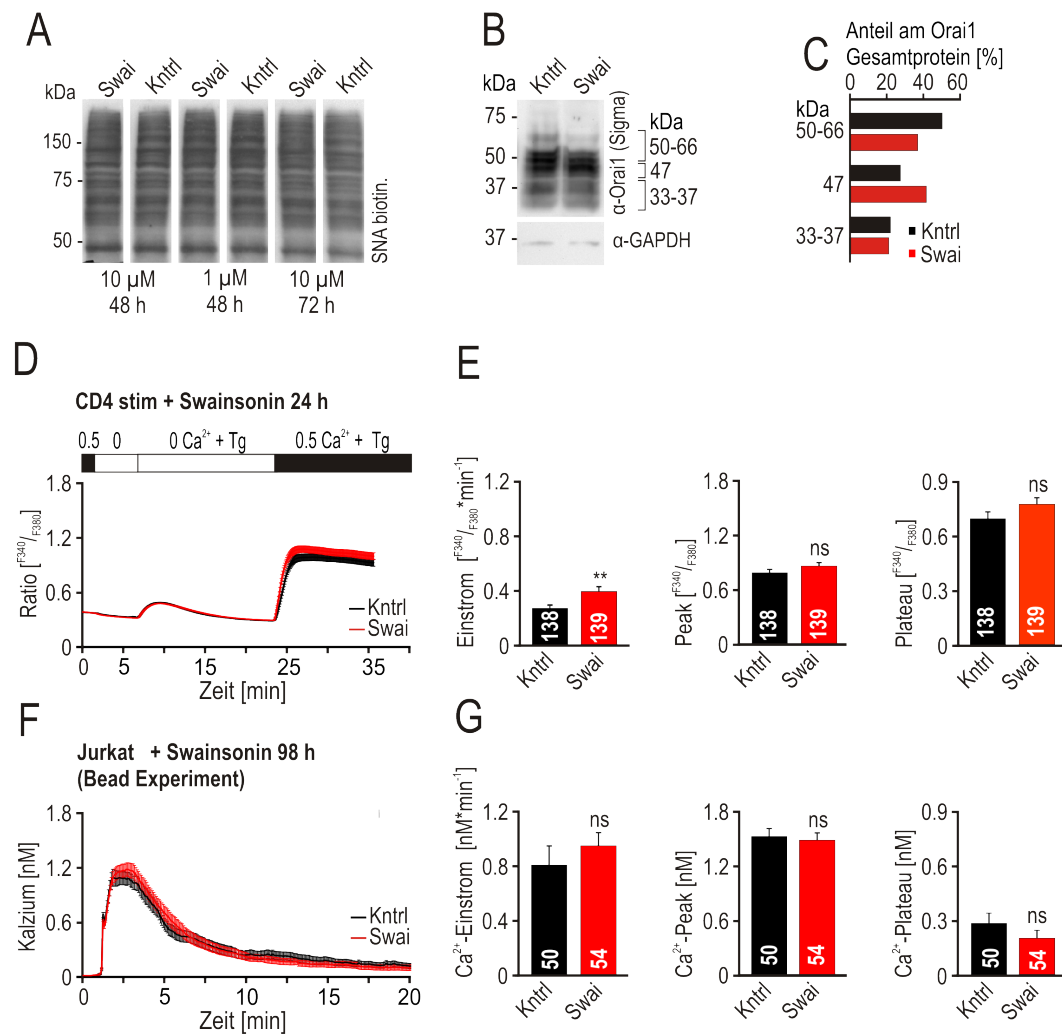


Abbildung 21: **Inhibition der Golgi-Mannosidase II mit Swainsonin.** **A:** Jurkat-T-Zellen nach Kontroll- (Kntrl) bzw. Swainsonin-Behandlung (Swai) in den angegebenen Konzentrationen und über die angegebene Zeitdauer wurden lysiert, lysierte Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mittels biotinylierter Lektine (SNA) und Avidin-HRP detektiert. **B:** Jurkat-T-Zellen wurden nach 72 h Inkubation mit 2 μg/ml (11,54 μM) Swainsonin (Swai) bzw. Methanol in der entsprechenden Verdünnung (Kntrl) lysiert, über SNA-*Beads* aufgereinigt und die Proteine der Eluat-Fraktion elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mittels α-Orai1 detektiert. **C:** Die Bandenvolumina aus B wurden bei den angegebenen Molekulargewichten densitometrisch bestimmt, der prozentuale Anteil am Orai1-Gesamtprotein berechnet und graphisch dargestellt. **D:** Stimulierte CD4-Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 h vor der Messung mit 0,5 μM Swainsonin (Swai; rot) bzw. Methanol (Kntrl; schwarz) in der entsprechenden Verdünnung behandelt. Die Änderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wurden mittels Fura-2 AM bei Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin gemessen (Ca²⁺-*Readdition*-Protokoll) und der mittlere zeitliche Verlauf von Ratio [F³⁴⁰/F₃₈₀] kalkuliert. **E:** Aus den Messungen in D wurden zusätzlich mittlere Einstromrate, Ratio-Peak und -Plateau ermittelt. **F:** Jurkat-T-Zellen wurden über einen Zeitraum von 98 h vor der Messung mit 2 μg/ml Swainsonin (Swai; rot) bzw. Methanol (Kntrl; schwarz) in der entsprechenden Verdünnung behandelt, Änderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mittels Fura-2 AM nach Applikation von α-CD3/α-CD28 Aktivator-*Beads* als Ratio [F³⁴⁰/F₃₈₀] gemessen, mit Hilfe der entsprechenden Kalibrationsmessung der mittlere zeitliche Verlauf der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bei zeitlich synchronisiertem Ca²⁺-Einstrom kalkuliert. **G:** Aus den Messungen in F wurden zusätzlich mittlere Einstromrate, Ca²⁺-Peak und -Plateau ermittelt. Die Anzahl der ausgewerteten Zellen pro Messung ist angegeben.

4.5 Funktionelle Charakterisierung der Orai1-Glykosylierungsmutante

Durch Mutation des Glykan-tragenden Asparagins an Position 223 in eine nicht glykosylierbare Aminosäure wie Alanin, kann die Glykosylierung von Orai1 komplett unterbunden werden. Mit diesem System sollte gezeigt werden, dass der SOCE-verstärkende Effekt der Deglykosylierung durch Tunicamycin, tatsächlich auf die Deglykosylierung von Orai1 selbst zurückzuführen ist. Zur Charakterisierung von SOCE bei Expression der Glykosylierungsmutante im Vergleich zur Wildtypvariante von Orai1, mussten beide Konstrukte heterolog exprimiert werden. Um ein System mit einer gleichbleibenden Expression des mutierten Konstruktes zur Verfügung zu haben, wurden zwei stabile Zelllinien generiert, von denen eine die HA-gekoppelte Wildtypvariante von Orai1 (Orai1_{WT}) und eine die HA-gekoppelte Glykosylierungsmutante von Orai1 (Orai1_{N223A}) exprimierte.

4.5.1 Stabile Überexpression von Orai1_{WT} und Orai1_{N223A} in Jurkat-T-Zellen und der Einfluss auf SOCE

Zunächst wurde der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom in Orai1_{WT} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen im Vergleich zu wildtypischen Jurkat-T-Zellen gemessen. Zur Einschätzung eines möglichen, funktionellen Effektes des veränderten STIM1/Orai1-Verhältnisses in den stabil HA-Orai1_{WT/N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen, wurde die stabile Zelllinie für die gleichen Messungen zusätzlich mit STIM1 transfiziert.

Dabei zeigten die stabil HA-Orai1_{WT} exprimierenden Jurkat-T-Zellen im Vergleich zu wildtypischen Jurkat-T-Zellen eine signifikante Reduktion des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms in der relativen Einstromrate, sowie den relativen Werten für Peak und Plateau.

Wurden die stabil HA-Orai1_{WT} exprimierenden Jurkat-T-Zellen zusätzlich mit STIM1 transfiziert, so kam es wieder zu einer signifikanten Verstärkung der relativen Einstromrate, auch wenn diese Verstärkung bei den relativen Peak- und Plateau-Werten nicht detektierbar war (s. Abb. 22A).

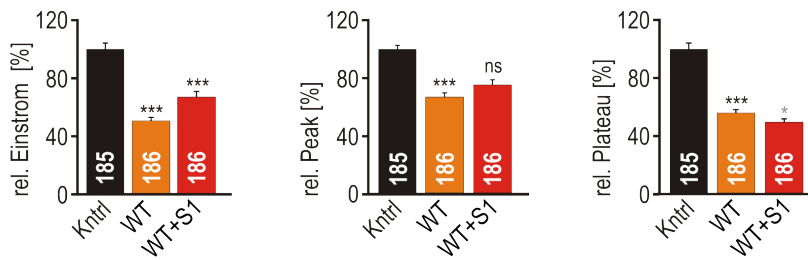
Die starke Zunahme der Proteinkonzentration von Orai1 in den stabil HA-Orai1_{WT} exprimierenden Jurkat-T-Zellen führt also zu einer signifikanten Reduktion des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms, wobei die zusätzliche Transfektion mit STIM1 den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom wieder erhöht.

Im nächsten Schritt wurden die stabil HA-Orai1_{WT} bzw. HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen mit und ohne Herunterregulation von endogenem Orai1 bezüglich ihres speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstromes direkt miteinander verglichen.

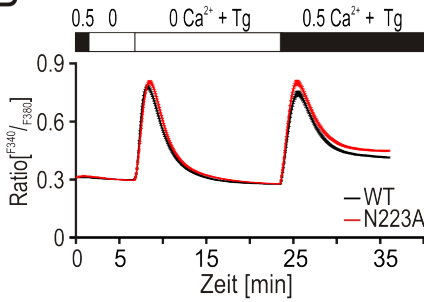
Dabei war der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom in den stabil HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen signifikant größer, als in den stabil HA-Orai1_{WT} exprimierenden Jurkat-T-Zellen; sowohl gemessen in Einstrom-Rate wie auch Ratio-Peak und -Plateau (s. Abb. 22B-C).

Die Transfektion mit siRNA gegen die 3'UTR von Orai1 sollte zu einer annähernd

A



B



C

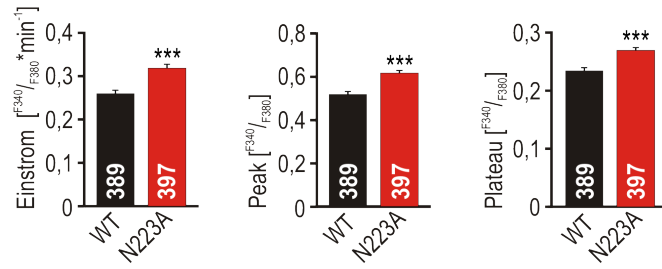


Abbildung 22: **Stabile Expression von HA-Orail_{WT/N223A} in Jurkat-T-Zellen I.** **A:** Stabil HA-Orail_{WT} exprimierende Jurkat-T-Zellen wurden falls angegeben 24 h vor Messung mit STIM1 (in pCAGGS-IRES-GFP) transfiziert. In wildtypischen Jurkat-T-Zellen (Kntrl; schwarz), untransfizierten stabil HA-Orail_{WT} exprimierenden Jurkat-T-Zellen (WT; gelb) und mit STIM1 transfizierten stabil HA-Orail_{WT} exprimierenden Jurkat-T-Zellen (WT+S1; rot) wurden die Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mittels Fura-2 AM als Ratio [$F_{340}^{Ca^{2+}}/F_{380}^{Ca^{2+}}$] bei Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin gemessen (Ca^{2+} -Readdition-Protokoll entsprechend des Perfusionsprotokolls in B) und mittlere Einstromrate, Ratio-Peak und -Plateau kalkuliert. Die Werte wurden auf wildtypische Jurkat-T-Zellen normiert und graphisch dargestellt. **B:** Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gemessen wie in A in stabil HA-Orail_{WT} (WT; schwarz) bzw. HA-Orail_{N223A} (N223A; rot) exprimierenden Jurkat-T-Zellen (teilweise durchgeführt von Ewa J. Slowik). **C:** Von den in B dargestellten Messungen wurden mittlere Einstromrate, Ratio-Peak und -Plateau kalkuliert. Die Anzahl der ausgewerteten Zellen pro Bedingung ist angegeben.

vollständigen Herunterregulation von endogenem, glykosyliertem Orai1 führen (s. Abb. 23A-B). Dadurch sollte in den stabil HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen die Expression von glykosyliertem Orai1 komplett ausgeschlossen und ein glykosylierungsbedingter Unterschied zwischen den Zelllinien theoretisch verstärkt werden. Nach Transfektion mit siRNA gegen die 3'UTR von Orai1 konnte in den HA-Orai1_{N223A} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen im Vergleich zu HA-Orai1_{WT} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen jedoch kein erhöhter Ca²⁺-Einstrom gemessen werden. Stattdessen wurde ein tendenziell erniedrigter Ca²⁺-Einstrom mit signifikant erniedrigtem Ratio-Plateau detektiert (s. Abb. 23C; durchgeführt von Ewa J. Slowik).

Um eine Beeinflussung der Kanalaktivität durch Unterschiede in der Proteinkonzentration auszuschließen, wurden auch die durchschnittlichen, relativen Protein-Level von HA-Orai1_{WT} und HA-Orai1_{N223A} in den stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen bestimmt (s. Abb. 23D-E).

Wie die durchschnittlichen, relativen Protein-Level von HA-Orai1_{WT} und HA-Orai1_{N223A} in den stabilen Jurkat T-Zelllinien zeigen, konnte zwischen den beiden Zelllinien kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

4.5.2 Einfluss von Tunicamycin auf SOCE in stabil Orai1_{WT/N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen

Um den Einfluss der Deglykosylierung auf die Orai1-Kanalaktivität unabhängig von der Proteinkonzentration in den stabil HA-Orai1_{WT/N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen beurteilen zu können, wurde in beiden Zelllinien der Einfluss von Tunicamycin auf den speichergesteuerten Ca²⁺-Einstrom untersucht.

Während die Behandlung mit Tunicamycin in stabil HA-Orai1_{WT} exprimierenden Zellen zu einer signifikanten Steigerung des speichergesteuerten Ca²⁺-Einstroms führte (s. Abb. 24A), zeigte die Behandlung in den stabil HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen einen deutlich geringeren Einfluss auf Einstromrate sowie Ca²⁺-Peak und -Plateau (s. Abb. 24B). Vergleicht man die relative Steigerung von SOCE durch Tunicamycin-Behandlung zwischen den stabil HA-Orai1_{WT} und HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen (s. Abb. 24C), so fand sich bei der stabil HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat T-Zelllinie eine signifikant geringere Steigerung in Einstromrate sowie Ca²⁺-Peak und -Plateau. Der Einfluss von Tunicamycin auf den speichergesteuerten Ca²⁺-Einstrom in T-Zellen wird also signifikant gemindert, wenn Orai1 in seiner unglykosylierten Form vorliegt.

4.5.3 SOCE nach physiologischer Stimulierung von stabil HA-Orai1_{WT} oder HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen

Um den Einfluss der Orai1-Glykosylierung auf SOCE induziert durch einen physiologischen Stimulus zu testen, wurden HA-Orai1_{WT} bzw. HA-Orai1_{N223A} exprimierende Jurkat-T-Zellen, mit α -CD3/ α -CD28-gekoppelten *Beads* aktiviert und die Einstromrate

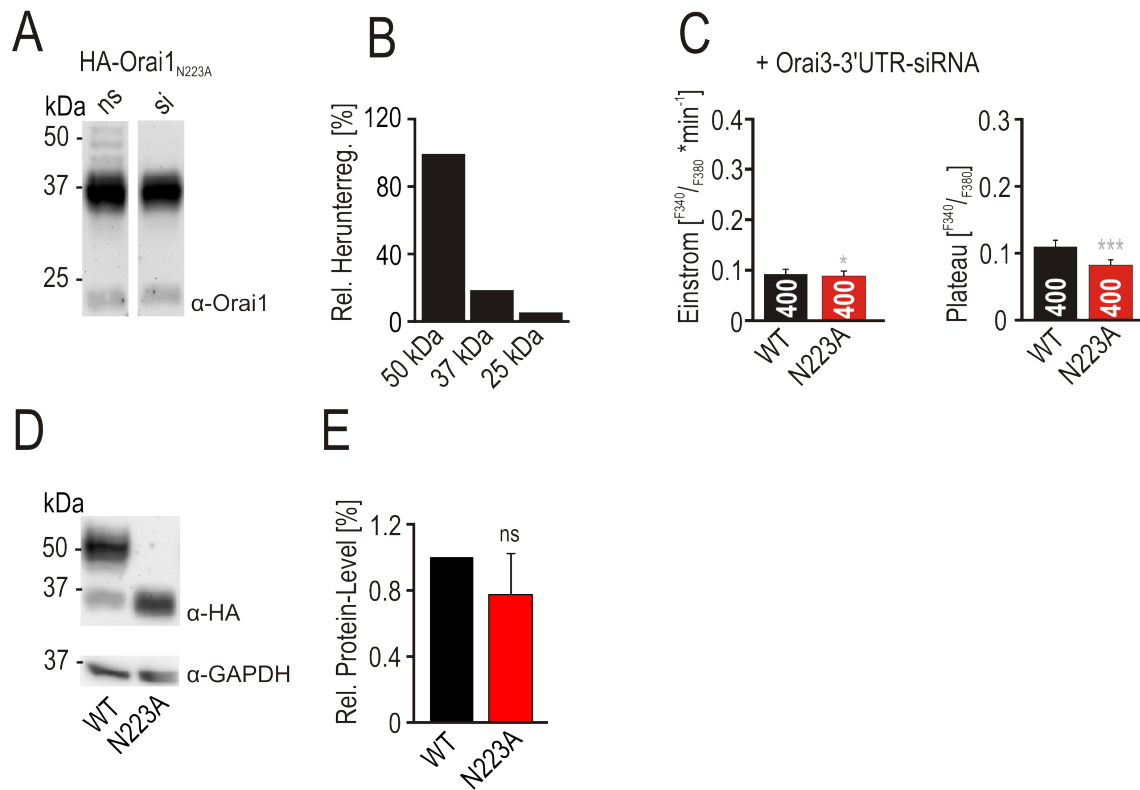


Abbildung 23: Stabile Expression von HA-Orai1_{WT}/N223A in Jurkat-T-Zellen II. **A:** Ly-sierte Proteine aus stabil HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Zellen die 48 h vor Ernte mit siRNA gegen Orai1-3'UTR (si) bzw. ns-siRNA (ns) transfiziert worden waren, wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit α-Orai1 (Sigma) detektiert (n=1). **B:** Die Bandendichten aus A wurden densitometrisch ausgewertet. Durch Vergleich mit der ns-Kontrolle wurde die relative Herunterregulation der einzelnen Produkt-Gruppen (getrennt nach Molekulargewicht in eine 50 kDa-, 37 kDa- und 25 kDa-Gruppe) nach siRNA-Behandlung ermittelt. **C:** Stabil HA-Orai1_{WT} (WT; schwarz) bzw. HA-Orai1_{N223A} (N223A; rot) exprimierende Jurkat-T-Zellen wurden 48 h vor der Messung mit siRNA gegen die 3'UTR von Orai1 transfiziert, Änderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mittels Fura-2 AM bei Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin als Ratio [F_{340}/F_{380}] gemessen (Ca²⁺-Readdition-Protokoll) und mittlere Einstromrate sowie Ratio-Plateau kalkuliert. Die Anzahl der ausgewerteten Zellen pro Messung ist angegeben (durchgeführt von Ewa J. Slowik). **D-E:** Stabil HA-Orai1_{WT} (WT; schwarz) bzw. HA-Orai1_{N223A} (N223A; rot) exprimierende Jurkat-T-Zellen wurden lysiert, lysierte Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mittels α-HA und α-GAPDH detektiert. **D:** Exemplarischer Westernblot. **E:** Durch densitometrische Bestimmung der detektierten Banden und Normierung auf das Haushaltsgen GAPDH sowie HA-Orai1_{WT} wurden die relativen Protein-Level berechnet, gemittelt und grafisch dargestellt (n=4).

sowie Ca^{2+} -Peak und -Plateau bestimmt.

Dabei führte bei stabiler Expression von HA-Orai1_{N223A} im Vergleich zu HA-Orai1_{WT} die Aktivierung von SOCE mit α -CD3/ α -CD28 gekoppelten *Beads* im Gegensatz zur Speicherentleerung mit Thapsigargin zu einer konsistenten und signifikanten Steigerung von Einstromrate sowie Ca^{2+} -Peak und -Plateau (s. Abb. 24D-E).

4.6 Expression von Orai1_{WT/N223A} in CHO_{WT/Lec}-Zellen

Um den Einfluss der Glykosylierung in einem System zu testen, das die Expression von Orai1 frei von jeglicher komplexer Glykosylierung ermöglicht, wurden vergleichende Messungen mit Orai1_{WT} und Orai1_{N223A} in CHO_{WT} und CHO_{Lec}-Zellen durchgeführt. CHO_{Lec}-Zellen sind defizient für mehrere Glykosyltransferasen sowie Zucker-Transporter und können Glykoproteine daher nur bis zur *Core*-Mannose Form prozessieren. CHO-Zellen verfügen außerdem über einen geringen, endogenen speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom, was sie zu einem guten Modellsystem für die Expression von exogenen Orai1-Konstrukten macht.

Zur Analyse der Orai1-Glykosylierung wurden CHO_{WT} und CHO_{Lec}-Zellen mit Orai1 (in pCAGGS_IRES-GFP) transfiziert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und Orai1 im Westernblot detektiert. Ein Teil der CHO_{WT}-Zellen wurde vor der Lyse zusätzlich mit Tunicamycin behandelt.

Während im Westernblot der Lysate aus unbehandelten CHO_{WT}-Zellen mehrere Orai1-Produkte mit Molekulargewichten um die 50 kDa detektiert werden konnten, konnten bei gleichem Nachweis von Orai1-Proteinen aus CHO_{Lec}-Zellen nur Orai1-Produkte mit einem Molekulargewicht bei ~ 35 -37 kDa nachgewiesen werden. Auch in den aufgetrennten und geblotteten Lysaten der Tunicamycin-behandelten CHO_{WT}-Zellen konnten fast ausschließlich Orai1-Produkte mit einem Molekulargewicht bei ~ 35 -37 kDa neben ein paar schwachen Banden im höhermolekularen Bereich detektiert werden (s. Abb. 25A).

Zunächst wurde der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom in CHO-Zellen ohne zusätzliche Expression von Orai1 und STIM1 aufgezeichnet. Danach wurden CHO_{WT}-Zellen sowie die glykosylierungsdefizienten CHO_{Lec}-Zellen mit STIM1 (in pCAGGS_IRES-RFP) und Orai1_{WT} bzw. Orai1_{N223A} (in pCAGGS_IRES-GFP) transfiziert und SOCE nach Thapsigargin induzierter Speicherentleerung gemessen.

Sowohl CHO_{WT}- wie auch CHO_{Lec}-Zellen zeigten ohne Transfektion mit exogenen Orai1- und STIM1-Konstrukten kaum speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom (s. Abb. 25B-C). Der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom wurde deutlich erhöht, wenn CHO_{WT}-Zellen mit Orai1 und STIM1 transfiziert wurden (~ 400 %ige Erhöhung)(s. Abb. 25D-E). Dieser Effekt ließ sich in CHO_{WT}-Zellen durch Expression von Orai1_{N223A} erneut signifikant steigern (~ 200 %ige Erhöhung). In CHO_{Lec}-Zellen hingegen bewirkte die Expression von Orai1_{N223A} im Vergleich zu Orai1_{WT} nur eine deutlich geringere Verstärkung von SOCE (~ 20 %)(s. Abb. 25F).

Beim Vergleich der relativen Verstärkung von SOCE in CHO_{WT}- und CHO_{Lec}-Zellen

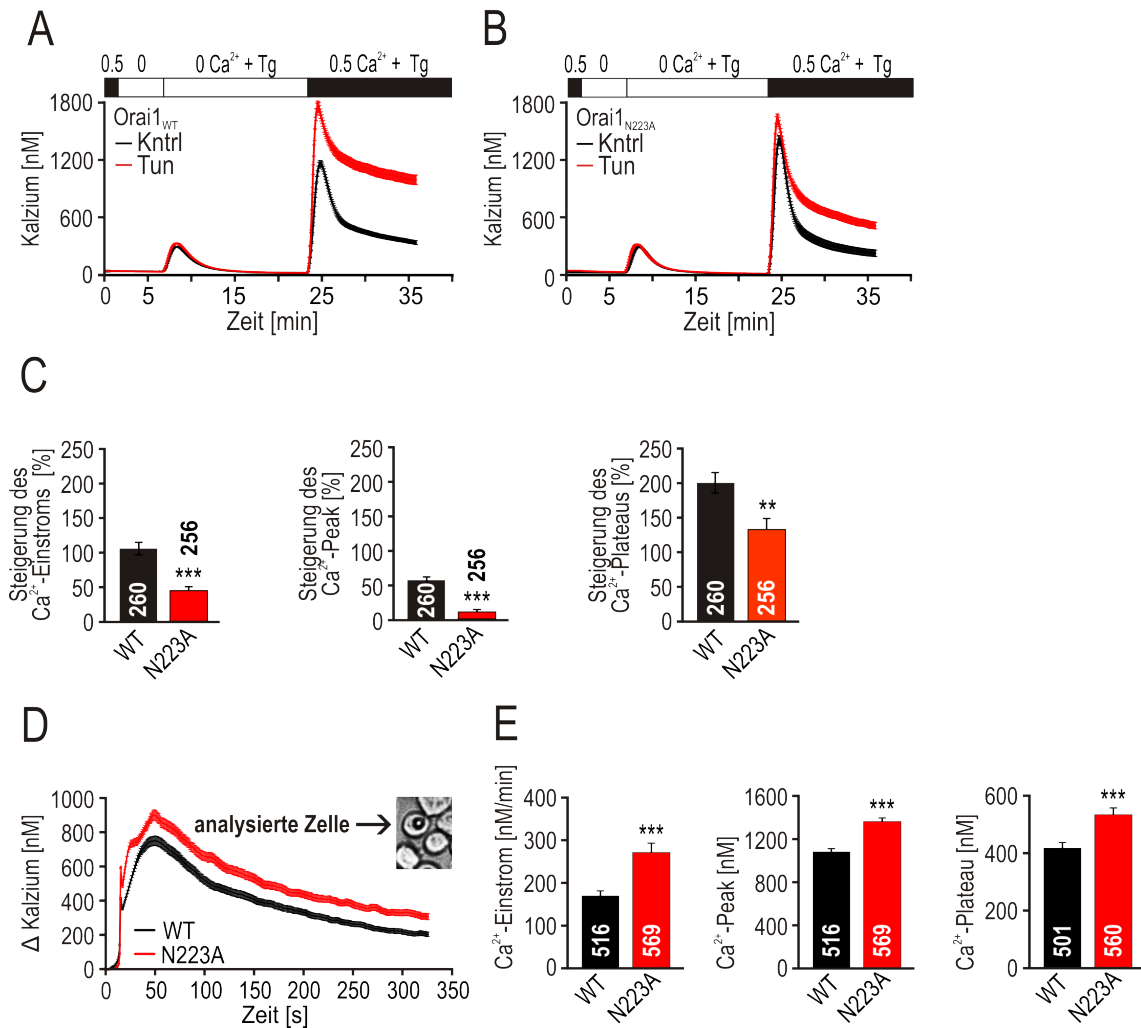


Abbildung 24: Die Wirkung von Tunicamycin und α -CD3/ α -CD28-Beads auf SOCE in HA-Orai1_{WT}/N223A stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen. **A:** Stabil HA-Orai1_{WT} exprimierende Jurkat-T-Zellen wurden 24 h vor der Messung mit Tunicamycin (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Tun; rot) bzw. DMSO (Kntrl; schwarz) in der gleichen Verdünnung behandelt, Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mittels Fura-2 AM als Ratio $[\text{F}^{340}/\text{F}_{380}]$ bei Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin (Ca^{2+} -Readdition-Protokoll) gemessen und mit Hilfe der entsprechenden Kalibrationsgleichung in $[\text{Ca}^{2+}]$ umgerechnet. Der zeitliche Verlauf der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde dargestellt und mittlere Einstromrate, sowie Ca^{2+} -Peak und -Plateau kalkuliert. **B:** Stabil HA-Orai1_{N223A} exprimierende Zellen wurden wie in A behandelt, gemessen und ausgewertet. **C:** Der mittlere relative Unterschied in Einstromrate, Peak- und Plateau-Werten zwischen Kontrollzellen und Tun-behandelten Zellen aus A und B wurde für stabil HA-Orai1_{WT} (WT; schwarz) und HA-Orai1_{N223A} (N223A; rot) exprimierende Jurkat-T-Zellen ermittelt und graphisch dargestellt. **D-E:** In stabil HA-Orai1_{WT} (WT; schwarz) und HA-Orai1_{N223A} (N223A; rot) exprimierenden Jurkat-T-Zellen wurden die Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Applikation von α -CD3/ α -CD28-Aktivator-Beads mittels Fura-2 AM als Ratio $[\text{F}^{340}/\text{F}_{380}]$ gemessen, mit Hilfe der entsprechenden Kalibrationsmessung in $[\text{Ca}^{2+}]$ umgerechnet und Einstromrate, Ca^{2+} -Peak und -Plateau kalkuliert. **D:** zeitlicher Verlauf der ΔCa^{2+} -Konzentration bei zeitlich synchronisiertem Ca^{2+} -Einstrom, normiert auf die Anfangs- Ca^{2+} -Konzentration **E:** graphische Darstellung der mittleren Einstromrate, sowie Ca^{2+} -Peak und -Plateau. Die Anzahl der ausgewerteten Zellen pro Bedingung ist angegeben.

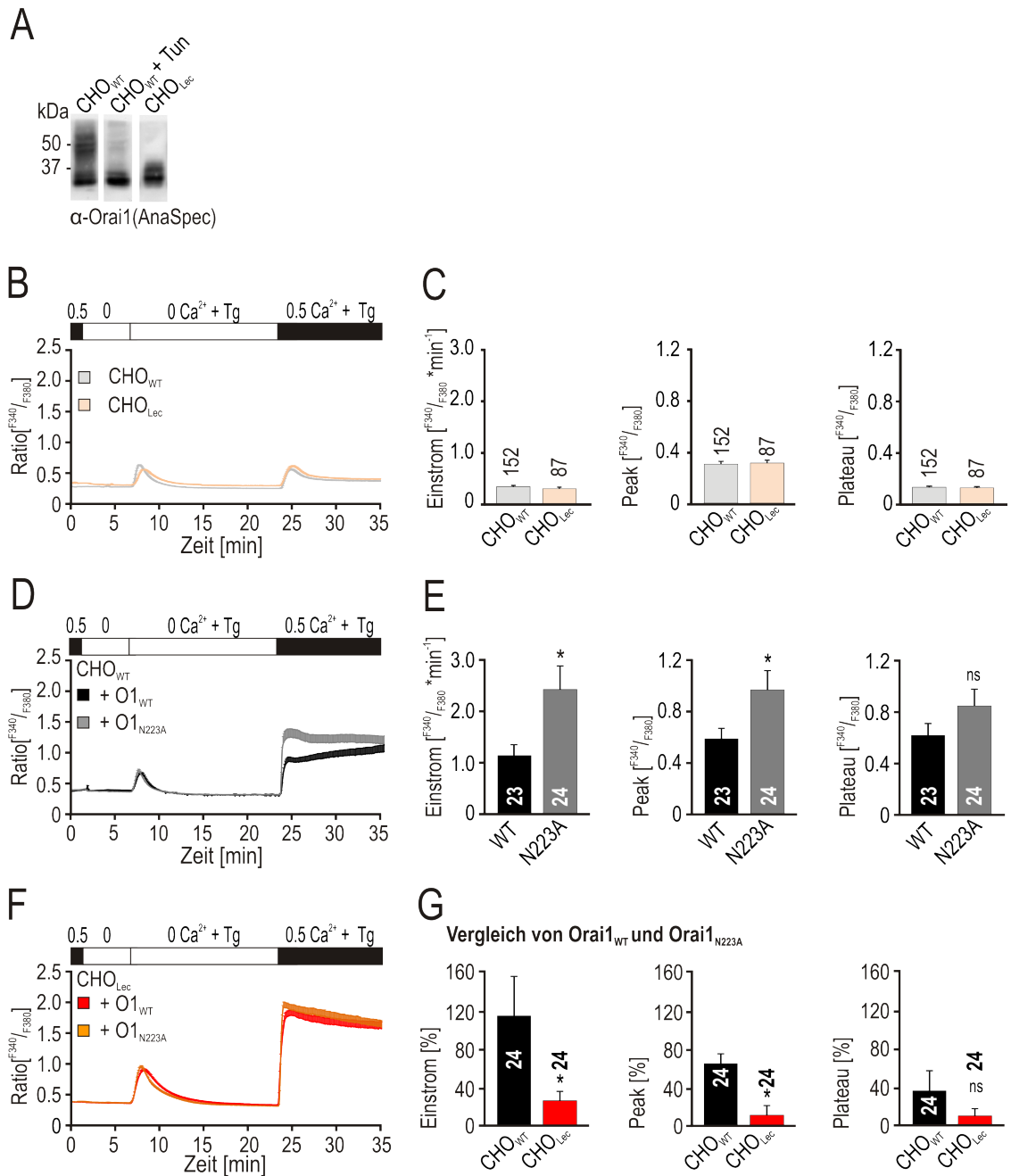


Abbildung 25: **Expression von Orai1_{WT}/N223A in CHO_{WT}/Lec-Zellen.** **A:** CHO_{WT}/Lec-Zellen wurden unbehandelt/nach Tunicamycin-Behandlung (+Tun) lysiert, lysierte Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung geblottet und mittels α-Orai1 (Anaspec) und α-STIM1 detektiert. **B:** Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration gemessen mittels Fura-2 AM als Ratio [F³⁴⁰/F₃₈₀] bei Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin (Ca²⁺-Readdition-Protokoll) in untransfizierten CHO_{WT}- (CHO_{WT}; hellgrau) und CHO_{Lec}-Zellen (CHO_{Lec}; rosa). **C:** Von den in B dargestellten Messungen wurden mittlere Einstromrate, Ratio-Peak und -Plateau kalkuliert. **D:** Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration gemessen wie in B in CHO_{WT}-Zellen transfiziert mit STIM1/Orai1_{WT} (WT; schwarz) bzw. STIM1/Orai1_{N223A} (N223A; grau). **E:** Von den in D dargestellten Messungen wurden mittlere Einstromrate, Ratio-Peak und -Plateau kalkuliert. **F:** Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration gemessen wie in B in CHO_{Lec}-Zellen transfiziert mit STIM1/Orai1_{WT} (WT; rot) bzw. STIM1/Orai1_{N223A} (N223A; orange). **G:** Die relative Verstärkung von SOCE bei Expression von Orai1_{N223A} statt Orai1_{WT} in CHO_{WT}- (CHO_{WT}; schwarz) und CHO_{Lec}-Zellen (CHO_{Lec}; rot) kalkuliert aus den Zellen in D-F für Einstromrate, Ratio-Peak und -Plateau. Die Anzahl der ausgewerteten Zellen ist angegeben.

durch Expression von Orai1_{N223A} statt Orai1_{WT}, zeigte sich in CHO_{Lec}-Zellen eine signifikant geringere Verstärkung von SOCE sowohl in Einstromrate wie auch in Ratio-Peak und -Plateau (s. Abb. 25G).

Um die Unterschiede zwischen CHO_{WT} und CHO_{Lec}-Zellen direkt für den Orai1-vermittelten Ca²⁺-Einstroms (I_{Orai1}) zu zeigen wurden zusätzlich Patch-Clamp-Experimente mit CHO_{WT} und CHO_{Lec}-Zellen durchgeführt, die mit STIM1 und zusätzlich entweder Orai1_{WT} oder Orai1_{N223A} transfiziert worden waren (durchgeführt von Tatiana Kilch).

Auch bei Betrachtung des Ca²⁺-Einstroms durch den Orai1-Kanal zeigte sich die signifikante Steigerung von I_{Orai1} durch Expression von Orai1_{N223A} statt Orai1_{WT} nur in CHO_{WT}-Zellen. Wurden CHO_{Lec}-Zellen mit Orai1_{N223A} statt Orai1_{WT} transfiziert, ließ sich keine signifikante Steigerung von I_{Orai1} messen (s. Abb. 26A-B).

4.6.1 Einfluss von Tunicamycin auf den speichergesteuerten Ca²⁺-Einstrom in CHO_{WT}-Zellen

Als Kontrolle wurde auch der Effekt von Tunicamycin auf CHO_{WT}-Zellen getestet.

Wie in den meisten getesteten Zelltypen war auch in den CHO_{WT}-Zellen nach Tunicamycin-Behandlung eine tendenzielle Verstärkung des speichergesteuerten Ca²⁺-Einstroms messbar, die allerdings deutlich geringer ausfiel, als die Verstärkung des speichergesteuerten Ca²⁺-Einstroms durch Expression von Orai1 in den glykosylierungsdefizienten CHO_{Lec}-Zellen statt in CHO_{WT}-Zellen. Das Ratio-Plateau war nach Tunicamycin-Behandlung zudem signifikant erniedrigt (s. Abb. 26C-D).

Während in stabilen Jurkat-T-Zellen die Expression von unglykosyliertem Orai1 (N223A) eine weitere Verstärkung des speichergesteuerten Ca²⁺-Einstroms durch Deglykosylierung (Tunicamycin) verhindert, verhindert in CHO-Zellen die fehlende komplexe Glykosylierung (CHO_{Lec}) eine weitere Verstärkung von SOCE durch Expression von Orai1_{N223A} statt Orai1_{WT}.

4.7 Der Einfluss von PHA auf den speichergesteuerten Ca²⁺-Einstrom

Das Lektin der Roten Kidney-Bohne (*Phaseolus vulgaris*), bekannt als PHA (Phytohemagglutinin), wurde schon früh wegen seiner mitogenen Aktivität zur Aktivierung von Lymphozyten verwendet [Demetriou et al., 2001] [Nowell, 1960] [Chilsont et al., 1984]. Das Bindemotiv von PHA ist Teil von n-glykosidisch verknüpften, verzweigten Oligosacchariden mit Galactose → N-Acetylglucosamin-Sequenzen in den äußeren Ketten und Mannose-Resten im Kern [Kornfeld et al., 1971]. Dieses Bindemotiv, das bei vielen komplex glykosylierten Proteinen vorkommt, könnte auch Teil der Glykosylierung von Orai1 sein. Um zu untersuchen, ob ein Teil der mitogenen Aktivität von PHA über einen direkten Einfluss auf Orai1 verursacht werden könnte und um darüber hinaus auch eine

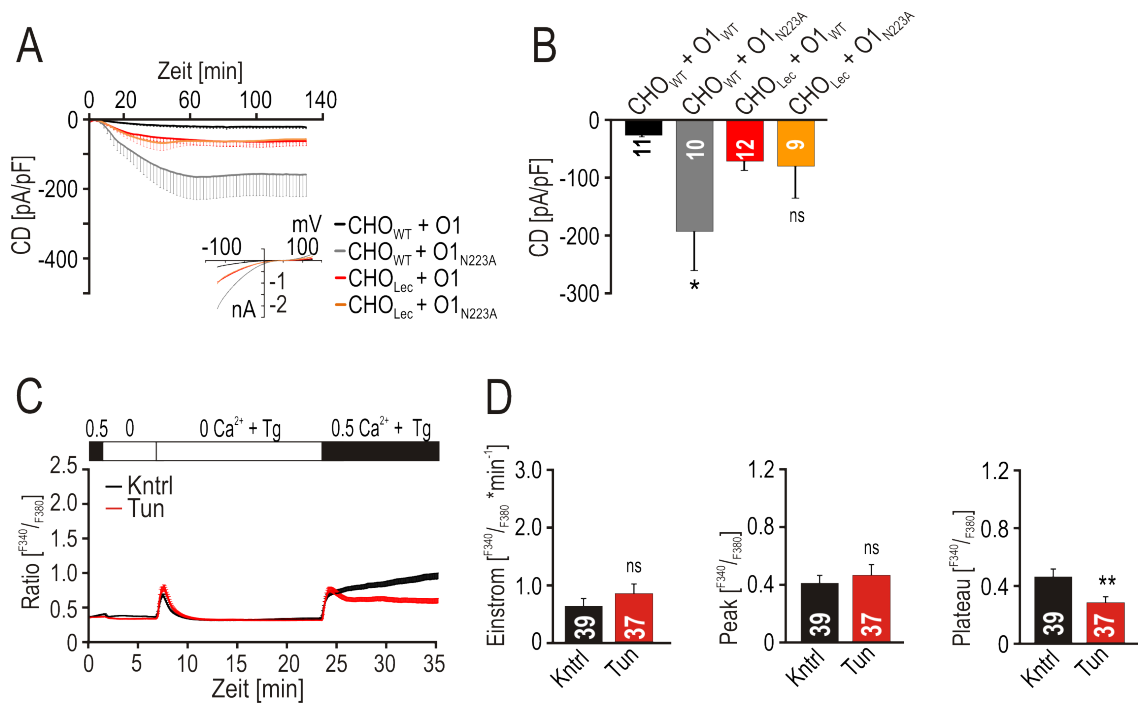


Abbildung 26: **I_{Orai1}** und **SOCE** in **CHO_{WT/Lec}-Zellen** transfiziert mit **Orai1_{WT/N223A}**.

A: Zeitlicher Verlauf der Stromdichte (CD) von I_{Orai1} in CHO_{WT}-Zellen transfiziert mit STIM1/Orai1_{WT} (CHO_{WT} + O1; schwarz) oder STIM1/Orai1_{N223A} (CHO_{WT} + O1_{N223A}; grau) bzw. CHO_{Lec}-Zellen transfiziert mit STIM1/Orai1_{WT} (CHO_{Lec} + O1; rot) oder STIM1/Orai1_{N223A} (CHO_{Lec} + O1_{N223A}; orange). Die entsprechenden durchschnittlichen Strom-Spannungs-Kurven (IV) zeigt das *Inset*. **B:** Mittlere Stromdichten der Zellen aus A nach vollständiger Entwicklung von I_{Orai1} (A und B durchgeführt von Tatiana Kilch). **C:** Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration gemessen mittels Fura-2 AM als Ratio [F³⁴⁰/F₃₈₀] bei Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin (Ca²⁺-Readdition-Protokoll) in CHO_{WT}-Zellen transfiziert mit STIM1 und Orai1_{WT}. Zusätzlich wurden die Zellen 24 h vor der Messung mit Tunicamycin (Tun, rot) bzw DMSO (Kntrl; schwarz) in der entsprechenden Verdünnung behandelt. **D:** Von den in C dargestellten Messungen wurden mittlere Einstromrate, Ratio-Peak und -Plateau kalkuliert. Die Anzahl der ausgewerteten Zellen pro Bedingung ist angegeben.

Aussage über die Art der Glykosylierung von Orai1 treffen zu können, wurde der Einfluss von PHA auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom untersucht.

Während bei Applikation von PHA zu Jurkat-T-Zellen eine allgemeine Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu detektieren war (s. Abb. 27A), führt eine Präinkubation (5 min) mit PHA weder zu einer konsistenten Zunahme des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstromes (s. Abb. 27B) noch zur einer Zunahme von I_{CRAC} (s. Abb. 27C; durchgeführt von Christine Peinelt und Sven Kappel).

4.8 Mögliche Ursachen für die Verstärkung von SOCE und I_{CRAC} durch Deglykosylierung

4.8.1 Der Einfluss einer CD95-Stimulation auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom

Effekte im Zusammenhang mit der Herunterregulation von ST6Gal1 konnten in anderen Veröffentlichungen auch im Kontext mit Apoptose gezeigt werden. Dabei führte die Herunterregulation von ST6Gal1 über eine verminderte Sialylierung des CD95-Rezeptors (FAS) zu einer Steigerung der Rezeptorfunktion, die über die Aktivierung verschiedener Caspasen in DNA-Fragmentierung und Desintegration der Zellmembran resultierte [Swindall and Bellis, 2011]. Nach Stimulierung von CD95 konnte außerdem eine Kollokalisierung von CD95 mit STIM1 und Orai1 und ein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom in CD95-nahen Regionen detektiert werden [Khadra et al., 2011].

Deshalb sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob die CRAC-amplifizierende Wirkung der Herunterregulation von ST6Gal1 vielleicht über eine Stimulation von CD95 vermittelt sein könnte und ob diese Stimulation zu einer Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt.

Für die Stimulation von CD95 wurde der CD95-Antikörper Apo1.1 verwendet. Zunächst wurde die proapoptotische Funktion des Antikörpers überprüft und auf eine potentielle Verstärkung durch Quervernetzung mit einem α -Maus-Antikörper oder Protein A getestet [Huang et al., 1999]. Danach wurde der Einfluss von Apo1.1 auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom untersucht.

Mit Hilfe des stabil exprimierten pCasper3-GR-Konstruktes konnten apoptotische Zellen an Hand ihres abnehmenden FRET-Signals identifiziert werden. Durch Kalkulation der relativen Anzahl apoptotischer Zellen, sowie der Abnahme des FRET-Signals/*Well* bei Messungen in 96-*Well*-Platten, konnte die proapoptotische Funktion von Apo1.1 als Zunahme apoptotischer Zellen deutlich gezeigt werden (s. Abb. 27D-E). Eine Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch eine Apo1.1-induzierte Aktivierung von CD95 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 27F).

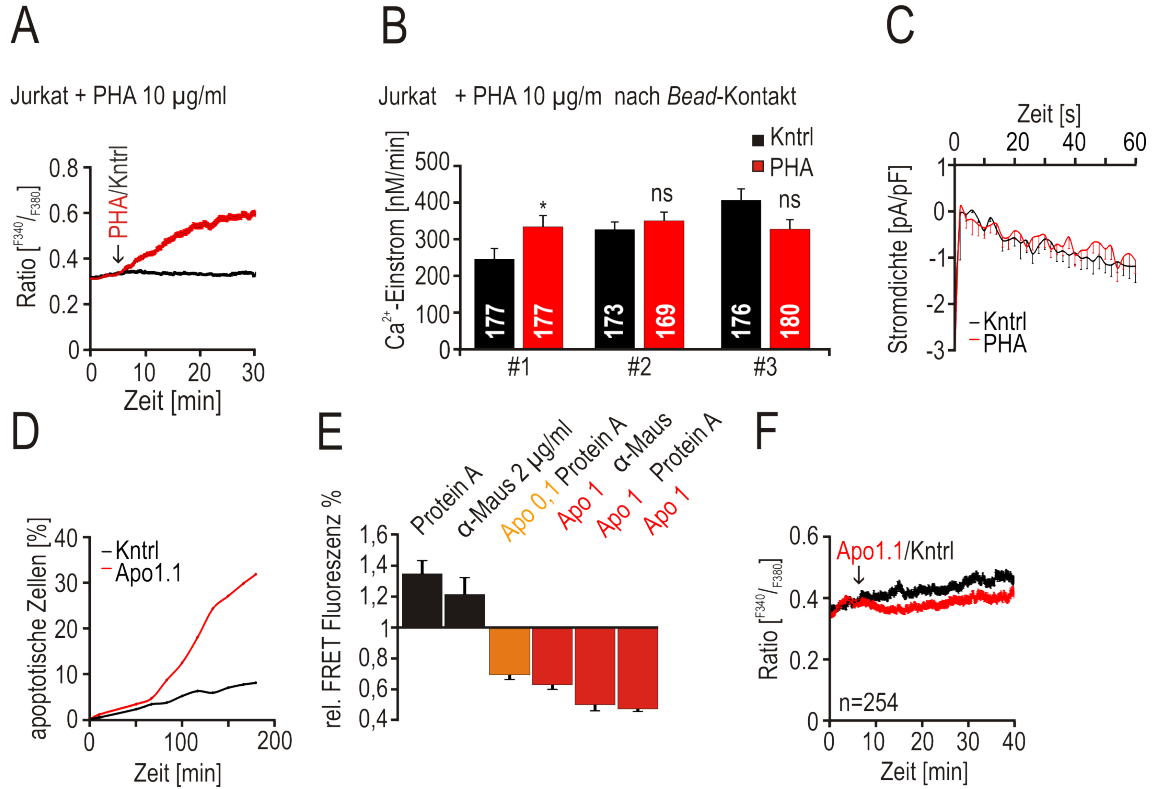


Abbildung 27: **Einfluss von PHA und α -CD95 (Apo1.1) auf SOCE und I_{CRAC} .** **A:** Zeitlicher Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration gemessen als Ratio $[F^{340}/F^{380}]$ in Jurkat-T-Zellen, die 250 s nach Start der Messung mit 10 µg/ml PHA (rot) bzw. Kontrolllösung (schwarz) perfundiert wurden. **B:** In drei unabhängigen Versuchen (#1-3) in Jurkat-T-Zellen präinkubiert für 5 min mit PHA 10 µg/ml (PHA; rot) bzw. Kontrolllösung (Kntrl; schwarz) wurden die Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Applikation von α -CD3/ α -CD28 Aktivator-*Beads* mittels Fura-2 AM (Ca^{2+} -Imaging) als Ratio $[F^{340}/F^{380}]$ gemessen, mit Hilfe der entsprechenden Kalibrationsmessung in Ca^{2+} -Konzentrationen umgerechnet und die mittlere Einstromrate kalkuliert. Alle Messungen in A-B wurden in 0,5 mM $CaCl_2$ -Lösung durchgeführt. **C:** Zeitlicher Verlauf der Stromdichte (CD) von I_{CRAC} in Jurkat-T-Zellen nach 10 minütiger Vorinkubation mit PHA 10 µg/ml oder Kontrolllösung (durchgeführt von Christine Peinelt und Sven Kappel). **D:** Das FRET-Signal stabil pCasper3-GR exprimierender Jurkat-T-Zellen wurde nach Zugabe des CD95 Antikörpers Apo1.1 (1 µg/ml) (Apo1.1; rot) bzw. Kontrolllösung (Kntrl; schwarz) über 3 h beobachtet, apoptotische Zellen über ein abnehmendes FRET-Signal identifiziert und als prozentualer Anteil von der Gesamtzellzahl angegeben. **E:** Das Gesamt-FRET-Signal stabil pCasper3-GR exprimierender Jurkat-T-Zellen pro *Well* wurde nach Zugabe der angegebenen Substanzen (Apo1.1 0,1 µg/ml oder 1 µg/ml) über 13 h beobachtet und aus Anfangs-FRET-Fluoreszenz (=1) und End-FRET-Fluoreszenz die relative FRET-Fluoreszenz am Ende der Messung kalkuliert (n=3). **F:** Zeitlicher Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration gemessen als Ratio $[F^{340}/F^{380}]$ in Jurkat-T-Zellen, die 400 s nach Start der Messung mit 1 µg/ml Apo1.1 (Apo1.1; rot) bzw. Kontrolllösung (Kntrl; schwarz) perfundiert wurden.

4.8.2 Die anteilige Lokalisation von Orai1 an der Plasmamembran

Bei gleicher Gesamtproteinkonzentration von Orai1 kann auch eine Veränderung des Anteils an plasmamembranständig exprimiertem Orai1-Protein zu einer Veränderung des Ca^{2+} -Einstroms führen. Um den prozentualen Anteil von Orai1 an der Plasmamembran zu bestimmen, wurden mit stabil HA-Orai1_{WT} bzw. HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen Biotinylierungsversuche durchgeführt. Durch Verwendung eines nicht-membrangängigen Biotinylierungsreagenz wurden alle Membranproteine mit freien Aminogruppen biotinyliert und über magnetische Streptavidin-*Beads* isoliert. Durch Vergleich der Orai1-Proteinmenge in der Eluat-Fraktion und dem Ganzzell-Lysat (Lysat-Fraktion) konnte so der relative Anteil an membranständigem Protein bestimmt werden.

Wenn auch kein signifikanter Unterschied zwischen stabil HA-Orai1_{WT} und den HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen zu messen war, so zeigte die HA-Orai1_{N223A} exprimierende Jurkat T-Zelllinie doch einen in allen Versuchen konsistent niedrigeren prozentualen Anteil an membranständigem Orai1-Protein (s. Abb. 28A-B).

4.8.3 Die Multimerisierung von Orai1

Eine weitere mögliche Erklärung für eine glykosylierungsbedingte, veränderte Kanalaktivität wäre eine veränderte Multimerbildung von Orai1 unter deglykosylierten Bedingungen. Zur Analyse der Oligomerisierung wurde Orai in stabil HA-Orai1_{WT} bzw. HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen unter unstimulierten Bedingungen mit dem membranpermeablen Reagenz DSP chemisch quervernetzt (*Cross-Linking*).

Mit Hilfe des chemischen *Cross-Linking* aller intra- und extrazellulärer Proteine und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Produkte kann nicht nur der Grad der Multimerisierung, sondern auch die Größe der detektierten Multimere bestimmt werden.

Neben unbehandelten HA-Orai1_{WT} und HA-Orai1_{N223A} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen wurden auch die Proteine Tunicamycin-behandelter, stabil HA-Orai1_{WT} exprimierender Jurkat-T-Zellen quervernetzt. Die Größe der einzelnen Mono- bzw. Multimer-Banden wurde mittels ihrer Laufstrecke und entsprechender Standards ermittelt.

Auch wenn die schwächere Auflösung im höhermolekularen Bereich nicht immer die eindeutige Identifizierung einzelner Produkte erlaubte, ließen sich HA-Orai1_{WT} und HA-Orai1_{N223A} beim Sortieren der einzelnen Produkte und anschließender Mittelung der Molekulargewichte sechs Produkte linear steigender Größe zuordnen (s. Abb. 28C-D). Die Molekulargewichte der identifizierten Produkte wurden gegen die Zahl der vermuteten Orai1-Monomere im Produkt aufgetragen, wobei die Steigung der Trendlinie außerdem eine Aussage über das Molekulargewicht der Monomere lieferte.

Isoliert aus stabil HA-Orai1_{WT} exprimierenden Jurkat-T-Zellen konnte für deglykosyliertes HA-Orai1 nach Behandlung mit Tunicamycin ein Monomer-Gewicht von ~ 38 kDa und für normal glykosyliertes HA-Orai1 ein Monomer-Gewicht von ~ 64 kDa ermittelt werden. Das Monomergewicht von HA-Orai1_{N223A} aus stabil HA-Orai1_{N223A} exprimierenden

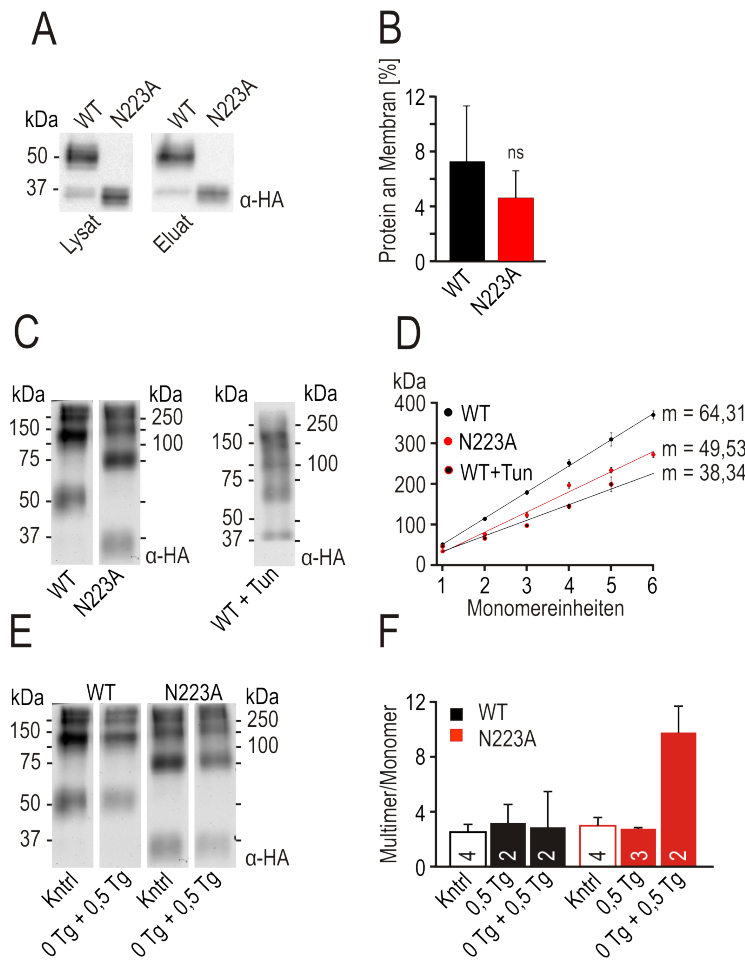


Abbildung 28: Oberflächenexpression und Oligomerisierung von Orai1. **A-B:** Stabil HA-Orai1_{WT} (WT; schwarz) und HA-Orai1_{N223A} (N223A; rot) exprimierende Jurkat-T-Zellen wurden biotinyliert, lysiert und die Proteine über magnetische Streptavidin-*Beads* aufgereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit α -HA detektiert. A: Exemplarischer Westernblot. B: Die HA-Orai1-Proteinmenge in den einzelnen Fraktionen wurde über densitometrische Bestimmung der Bandendichte ermittelt und der Anteil von retiniertem und damit membranständigem HA-Orai1 an der Gesamtmenge von HA-Orai1 kalkuliert und gemittelt (n=3). **C-D:** Alle Proteine von stabil HA-Orai1_{N223A} (N223A; rot) bzw. HA-Orai1_{WT} (WT; schwarz) exprimierenden Jurkat-T-Zellen, die falls angegeben 24 h mit Tunicamycin (WT+Tun; rot-schwarz) behandelt worden waren, wurden chemisch quervernetzt, nach Lyse gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mittels α -HA detektiert. C: Exemplarischer Westernblot. D: Durch Vergleich mit der Laufstrecke des Größenstandards wurde das Molekulargewicht der einzelnen Produkte kalkuliert und inklusive Steigung graphisch dargestellt (n (l.-r.) = WT: 3,12,15,15,15,12; N223A: 7,10,10,10,10,4; WT+Tun: 2,4,4,4,4,4). **E-F:** Alle Proteine von stabil HA-Orai1_{WT} (WT; schwarz) und HA-Orai1_{N223A} (N223A; rot) exprimierenden Jurkat-T-Zellen wurden ohne Speicherentleerung (Kntrl; ungefüllt) bzw. nach gleichzeitiger Entleerung der Speicher und Induzierung von SOCE durch 10 min Inkubation mit 1 μ g/ml Thapsigargin (Tg) in 0,5 mM CaCl₂-Lösung (0,5 Tg; gefüllt) bzw. sequenzieller Speicherentleerung und Induzierung von SOCE durch Inkubation für 15 min mit 1 μ g/ml Tg in 0 mM CaCl₂-Lösung und Inkubation für 5 min mit 1 μ g/ml Tg in 0,5 mM CaCl₂-Lösung (0 Tg + 0,5 Tg; gefüllt) chemisch quervernetzt, aufgetrennt und detektiert wie in C. E: Exemplarischer Westernblot. F: Die Summe der Bandenvolumina aller Multimer-Banden und das Bandenvolumen der Monomer-Bande jeder Probe wurden densitometrisch bestimmt und als Quotient gemittelt über alle Messungen einer Bedingung graphisch dargestellt. Die Anzahl der ausgewerteten Blots ist in der Grafik angegeben.

Jurkat-T-Zellen lag mit ~ 50 kDa dazwischen.

Zur Ermittlung eines möglichen Einfluss der Glykosylierung auf den Grad der Multimerisierung in Abhängigkeit von der Speicherentleerung, wurden stabil HA-Orai1_{WT} und HA-Orai1_{N223A} exprimierende Jurkat-T-Zellen unstimuliert oder nach Thapsigargin induzierter Speicherentleerung mit *Cross-Linking*-Reagenz behandelt. Die Lysate wurden aufgetrennt, geblottet, HA-Orai1 mittels α -HA detektiert und der Quotient aus Bandendichte der Multimer-Banden und Bandendichte der Monomer-Bande ermittelt.

Während die Kanalaktivierung bei stabil HA-Orai1_{WT} exprimierenden Jurkat-T-Zellen keinen Einfluss auf den Multimerisierungsstatus von Orai1 zeigt, wird in stabil HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen die Multimerisierung von Orai1 durch Kanalaktivierung verstärkt (s. Abb. 28E-F).

4.9 Die Interaktion von Orai1 mit glykobindenden Proteinen

4.9.1 Die Interaktion von Orai1 mit Siglecs

Die endständige Position der Oligosaccharid-Struktur von Glykoproteinen wird häufig von Sialylsäuren eingenommen. Diese maskieren auf der einen Seite Zuckerreste in zweitäußerten Positionen (subterminal), auf der anderen Seite dienen sie als Erkennungssequenz für die Familie der Sialylsäure-bindenden Proteine namens Siglecs. Diese erkennen meist die endständige Sialylsäure; häufig in Verbindung mit ihrer Verknüpfung zum nächsten Zucker. In einigen Fällen kann jedoch auch die nachfolgende Zuckerkette die Bindungsaffinität beeinflussen [Crocker and Varki, 2001].

So erfordert die Bindung von Siglec-8, das wegen seines Einflusses auf die NFAT-Translokalisierung [Sharma et al., 2013] auch als potentieller Interaktionspartner für Orai1 in Frage kommen könnte, zusätzlich die Sulfatierung der an die Sialylsäure geknüpften Galaktose (NeuAc α -2-3(6-O-sulfo)Gal β -1-4(Fuc α -1-3)GlcNAc) [Bochner et al., 2005].

Zunächst wurde die Expression ausgewählter Siglecs in Jurkat-T-Zellen und HMC1.2-Mastzellen mittels qRT-PCR untersucht. Dabei war die nachgewiesene mRNA-Menge der meisten getesteten Siglecs in HMC1.2-Mastzellen deutlich höher, als in Jurkat-T-Zellen, wo die gemessene mRNA-Menge der meisten Siglecs im Bereich der Nachweisgrenze lag, was eine genaue Bestimmung erschwerte. Lediglich von Siglec-10-mRNA konnte in beiden Zelltypen etwa die gleiche Menge detektiert werden. Besonders auffallend war die Expression von Siglec-6, von welchem in HMC1.2-Mastzellen etwa 70mal mehr mRNA detektiert werden konnte, als von allen anderen getesteten Siglecs (s. Abb. 29A).

Um den Einfluss einer möglichen Glykan-Sulfatierung auf SOCE aufzudecken, wurden Jurkat-T-Zellen durch Behandlung mit NaClO₃ desulfatiert und anschließend SOCE gemessen. Zusätzlich wurden die gleichen Messungen in der Mastzelllinie HMC1.2 durchgeführt, die eine wesentlich höhere Expression von Siglec-8 zeigt.

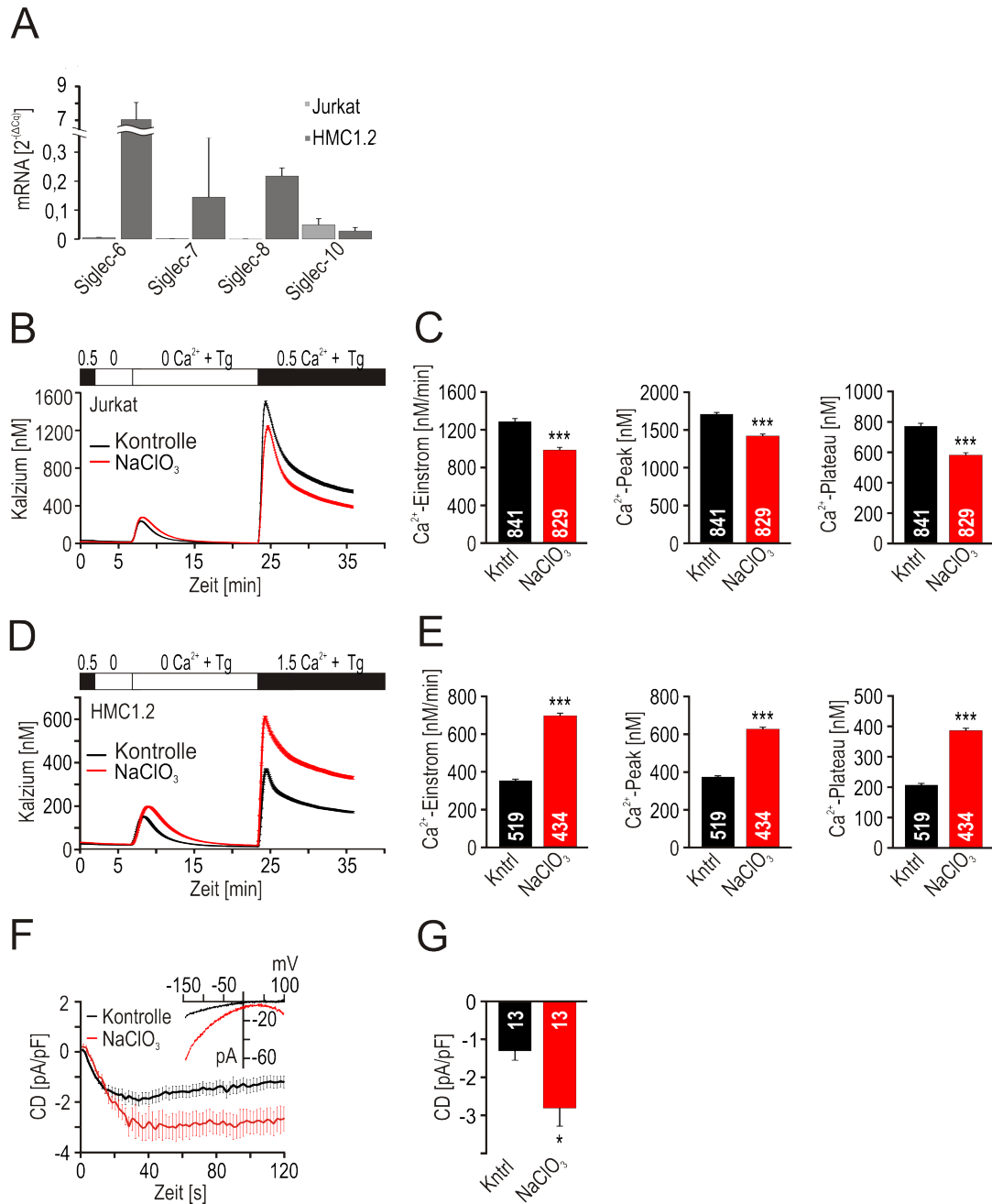


Abbildung 29: **Einfluss von NaClO₃ auf SOCE und I_{CRAC}**. **A**: mRNA-Level von Siglec-6, Siglec-7, Siglec-8 und Siglec-10 in unbehandelten Jurkat-T-Zellen (hellgrau) und HMC1.2-Mastzellen (dunkelgrau) (durchgeführt von Gertrud Schwär)(n=3). **B**: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration gemessen mittels Fura-2 AM als Ratio [F₃₄₀/F₃₈₀] bei Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin (Ca²⁺-Readdition-Protokoll) in Jurkat-T-Zellen nach 7 d Kultivierung unter Zusatz von 50 mM NaClO₃ (NaClO₃; rot) bzw. Kontrolllösung (Kntrl; schwarz) und kalibriert mit Hilfe der entsprechenden Kalibrationsgleichung. **C**: Von den in B dargestellten Messungen wurden mittlere Einstromrate, Ca²⁺-Peak und -Plateau kalkuliert. **D**: HMC1.2-Mastzellen wurden behandelt und analysiert wie in B. **E**: Mittlere Einstromrate, Ca²⁺-Peak und -Plateau kalkuliert für die Zellen aus D. **F**: Zeitlicher Verlauf der Stromdichte (CD) von I_{CRAC} in HMC1.2-Mastzellen kultiviert wie in B. Die entsprechenden durchschnittlichen Strom-Spannungs-Kurven (IV) zeigt das Inset. **G**: Mittlere Stromdichte der Zellen aus F nach vollständiger Entwicklung von I_{CRAC} (durchgeführt von Christine Peinelt und Sven Kappel). Die Anzahl der ausgewerteten Zellen ist in den Abbildungen angegeben.

Während in Jurkat-T-Zellen keine Erhöhung des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom zu messen war und die Behandlung mit NaClO_3 den Einstrom sogar signifikant verringert (s. Abb. 29B-C), führte die Behandlung der HMC1.2-Mastzellen mit NaClO_3 zu einer signifikanten Steigerung des Ca^{2+} -Einstroms in Bezug auf Einstromrate, wie auch auf Ca^{2+} -Peak und -Plateau (Abbildung 29D-E). Um den direkten Einfluss der NaClO_3 -Behandlung auf den Orai1-Kanal zu untersuchen, wurde in HMC1.2-Mastzellen mit und ohne NaClO_3 -Behandlung auch I_{CRAC} mit Hilfe von Patch-Clamp-Messungen bestimmt (durchgeführt von Christine Peinelt und Sven Kappel).

Auch in den Patch-Clamp-Messungen konnte nach Behandlung mit NaClO_3 eine signifikante Steigerung des Orai1-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms gezeigt werden (s. Abb. 29F-G). Der amplifizierende Effekt von NaClO_3 auf SOCE kann damit direkt auf eine Steigerung des Ca^{2+} -Einstroms durch den Orai1-Kanal zurückgeführt werden.

Um auszuschließen, dass die Amplifikation von I_{CRAC} nicht durch eine NaClO_3 -induzierte, veränderte Proteinexpression der Schlüsselproteine STIM1 und Orai1 verursacht wird, wurden von Orai1 und STIM1 sowohl mRNA-Level mittels qRT-PCR, wie auch Protein-Level mittels densitometrischer Westernblot-Analysen in Jurkat-T-Zellen und HMC1.2-Mastzellen mit und ohne NaClO_3 -Behandlung bestimmt.

Jurkat-T-Zellen zeigten nach Behandlung mit NaClO_3 keine signifikanten Unterschiede im mRNA- und relativen Protein-Level von Orai1, während mRNA- und relatives Protein-Level von STIM1 im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant erhöht waren (s. Abb. 30A-C). Obwohl die Behandlung mit NaClO_3 bei HMC1.2-Mastzellen im Durchschnitt zu einer Verdopplung der relativen mRNA-Level von Orai1 und STIM1 führte, war der Unterschied nicht signifikant (s. Abb. 30D). Auf Proteinebene zeigten HMC1.2-Mastzellen nach NaClO_3 -Behandlung lediglich für das relative Level von STIM1 eine tendenzielle Steigerung verglichen mit den Kontrollzellen, die aber ebenfalls nicht signifikant war (s. Abb. 30E-F).

Da Siglec-8 wegen seines Einflusses auf die NFAT-Translokation besonders interessant ist und Siglec-6 in HMC1.2-Mastzellen ungewöhnlich hoch exprimiert wird (s. Abb. 29A), wurden diese beiden Siglecs Experimente mit siRNA-vermittelter Herunterregulation ausgewählt.

Bei siRNA-vermittelter Herunterregulation von Siglec-6 auf etwa 20 % (s. Abb. 31A), konnte 24 h nach Transfektion für SOCE eine signifikante Steigerung von Einstromrate, sowie Ca^{2+} -Peak und -Plateau nachgewiesen werden (s. Abb. 31B-C).

Die siRNA-vermittelte Herunterregulation von Siglec-8 funktionierte weniger effizient als die von Siglec-6 und führte nur zu einer Absenkung des mRNA-Levels auf etwa 40 %. Um sich den *Turnover* des Proteins zu Nutze zu machen und effektiv ein niedrigeres Protein-Level zu erreichen, wurde die Transfektion mit der siRNA gegen Siglec-8 sequenziell 48 h und 24 h vor der Messung durchgeführt, wobei die Herunterregulation auf mRNA-Level konstant blieb (s. Abb. 31A).

Dabei konnte durch sequenzielle Herunterregulation von Siglec-8 ebenfalls eine signifi-

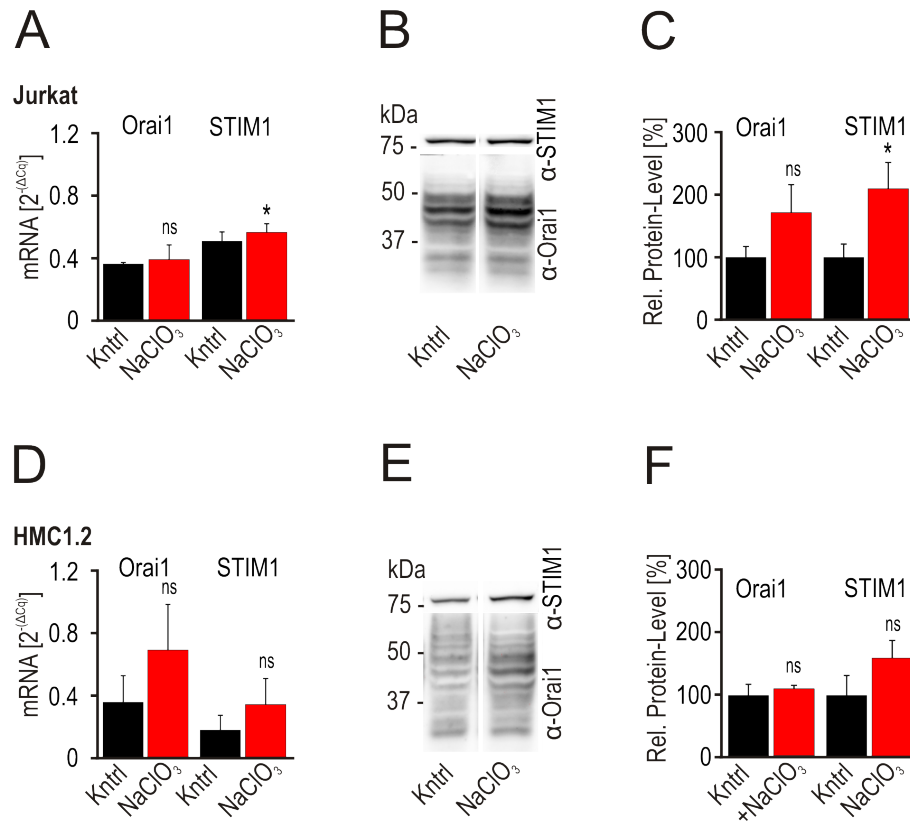


Abbildung 30: **Einfluss von NaClO₃ auf die Expression von Orai1 und STIM1.** **A:** mRNA-Level von Orai1 und STIM1 in Jurkat-T-Zellen nach 7 d Kultivierung unter Zusatz von 50 mM NaClO₃ (NaClO₃; rot) bzw. Kontrolllösung (Kntrl; schwarz) (n=3) (durchgeführt von Gertrud Schwär). **B-C:** Jurkat-T-Zellen behandelt wie in A wurden lysiert, Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mittels α-Orai1 (Sigma) und α-STIM1 detektiert. B: Exemplarischer Westernblot. C: Graphische Darstellung der auf die Kontrollzellen normierten und gemittelten Bandendichten aller Messungen nach densitometrischer Bestimmung (n=4). **D:** mRNA-Level von Orai1 und STIM1 in HMC1.2-Mastzellen behandelt wie in A (durchgeführt von Gertrud Schwär). **E-F:** HMC1.2-Mastzellen behandelt wie in A wurden lysiert, Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mittels α-Orai1 (Sigma) und α-STIM1 detektiert. E: Exemplarischer Westernblot F: Graphische Darstellung der auf die Kontrollzellen normierten und gemittelten Bandendichten aller Messungen nach densitometrischer Bestimmung (n=4).

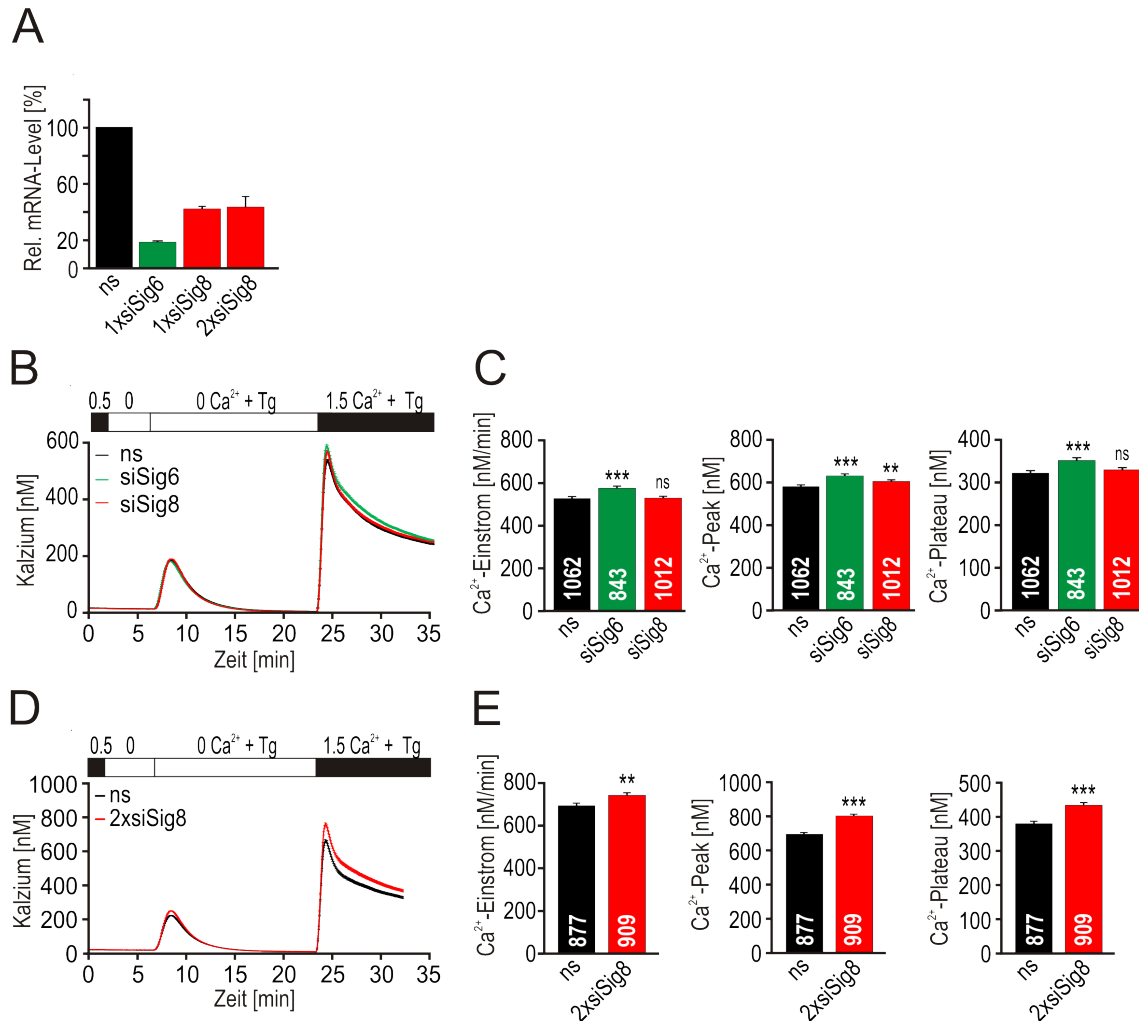


Abbildung 31: **Einfluss der Herunterregulation von Siglec-6 und -8 auf SOCE.** **A:** Relative mRNA-Level von Siglec-6 (grün) und Siglec-8 (rot) in HMC1.2-Mastzellen die 24 h vor Ernte (1x) oder sequenziell 24 und 48 h vor Ernte (2x) mit siRNA gegen Siglec-6 (siSig6) oder Siglec-8 (siSig8) bzw. ns-siRNA (ns) transfiziert und auf die ns-Kontrolle normiert wurden (durchgeführt von Gertrud Schwär). **B:** Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration gemessen mittels Fura-2 AM als $[F^{340}/F_{380}]$ bei Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin (Ca²⁺-Readdition-Protokoll) in HMC1.2-Mastzellen die 24 h vor Messung mit siRNA gegen Siglec-6 (siSig6; grün), Siglec-8 (siSig8; rot) oder ns-siRNA (ns; schwarz) transfiziert wurden. Die Ratio $[F^{340}/F_{380}]$ -Werte wurden mit Hilfe der entsprechenden Kalibrationsmessung in Ca²⁺-Konzentrationen umgerechnet. **C:** Von den in B dargestellten Messungen wurden mittlere Einstromrate, Ca²⁺-Peak und -Plateau kalkuliert. **D:** Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration gemessen wie in B in HMC1.2-Mastzellen die 24 h und 48 h vor Messung mit siRNA gegen Siglec-8 (siSig8; rot) bzw. ns-siRNA (ns; schwarz) transfiziert wurden. Die Kalibration erfolgte wie in B. **E:** Von den in D dargestellten Messungen wurden mittlere Einstromrate, Ca²⁺-Peak und -Plateau kalkuliert.

kante Steigerung von SOCE in Einstromrate, Ca^{2+} -Peak und -Plateau gezeigt werden (s. Abb. 31D-E).

4.9.2 Die Interaktion von Orai1 mit Galektinen

Neben Siglecs kommen auch Galektine mit ihren pleiotropen Rollen im angeborenen und erworbenen Immunsystem [Yang et al., 2008] als potentielle Bindungspartner für eine Interaktion mit Orai1 in Frage. Im Gegensatz zu den Sialylsäure-bindenden Siglecs, binden Galektine Glykokonjugate, die das Disaccharid-Motiv $\text{Gal}\beta\text{-1-4GlcNAc}$ (LacNAc) enthalten [Rabinovich and Toscano, 2009]. Die Galektin-Bindung kann so durch Zugabe von Laktose inhibiert werden [Perillo et al., 1995].

Gemittelt über alle Messungen führte die Inkubation mit Laktose zu einer signifikanten Abnahme des Ca^{2+} -Einstroms nach Speicherentleerung (s. Abb. 32B). Die Ergebnisse der einzelnen Messtage (#1-6) wiesen jedoch eine hohe Variabilität auf (s. Abb. 32A). Die Patch-Clamp-Messungen von I_{CRAC} nach Inkubation mit Laktose konnten keinen signifikanten Unterschied aufdecken. Tendenziell war aber wie bei den Ca^{2+} -Imaging-Messungen von SOCE, eine Reduktion des Ca^{2+} -Einstromes zu detektieren (s. Abb. 32C; durchgeführt von Tatiana Kilch).

Um eine mögliche Interaktion von Orai1 mit Galektin-1, -3 und -9 aufzudecken, wurden Lysate aus stabil HA-Orai1_{WT} bzw. HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen über α -HA-Agarose aufgereinigt. Neben Orai1 sollten mit dieser Methode auch Orai1 bindende Proteine aus dem Lysat isoliert werden (Koimmunpräzipitation).

Während HA-Orai1 sowohl bei HA-Orai1_{WT} wie auch HA-Orai1_{N223A} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen immer im Eluat nachgewiesen werden konnte, war dort weder der Nachweis von Galektin-1, -3 noch -9 möglich (s. Abb. 32D-E). Weder die direkte Bindung von Galektin-1,-3 noch -9 an Orai1 konnte also nachgewiesen werden.

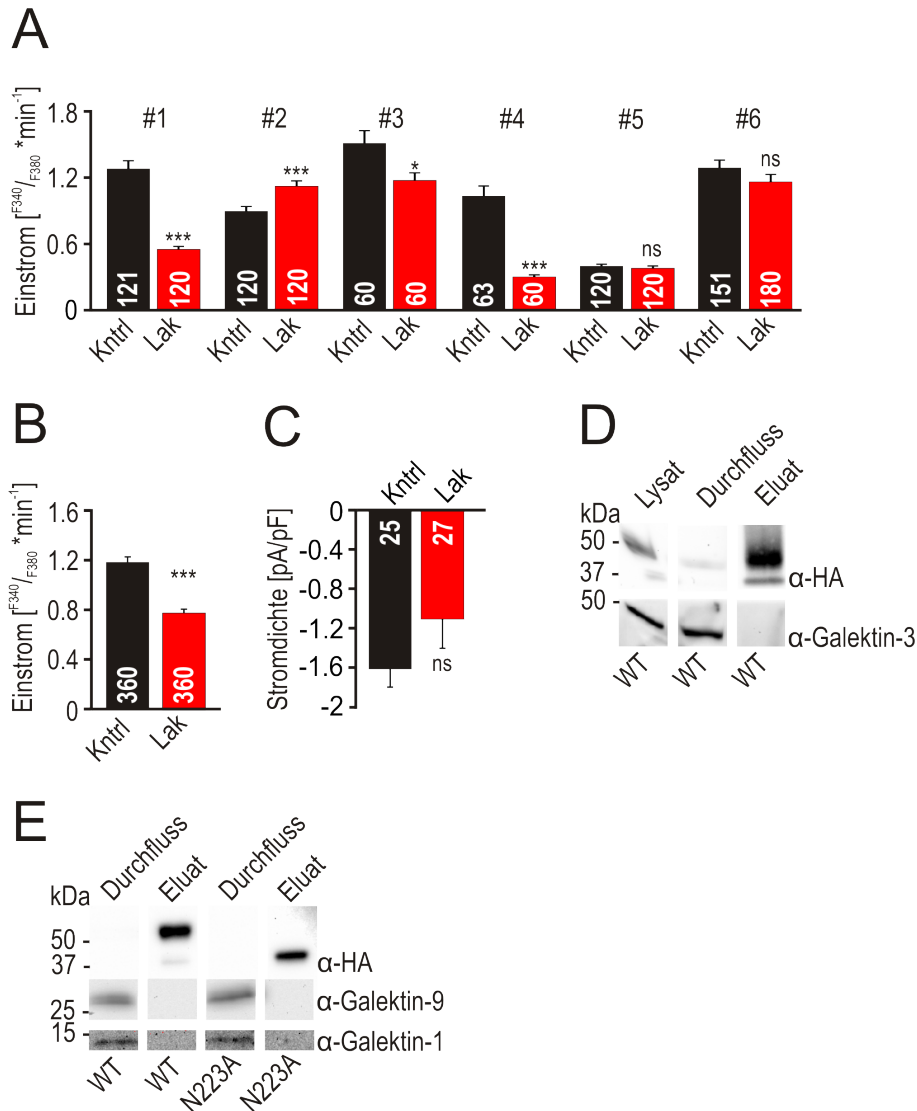


Abbildung 32: **Interaktionen von Galectinen mit Orai1.** **A:** Mittlerer Ca^{2+} -Einstrom gemessen mittels Fura-2 AM als Ratio $[F_{340}/F_{380}]$ nach Aktivierung von SOCE durch Thapsigargin (Ca^{2+} -*Readdition*-Protokoll mit Thapsigargin in 0,5 mM CaCl_2 nach 1400 s) in Jurkat-T-Zellen, die 30 min vor Messung mit 2 mM Laktose (Lak; rot) bzw. Kontrolllösung (Kntrl; schwarz) inkubiert wurden. Die mittleren Einstrom-Werte der einzelnen Messtage (#1-6) wurden graphisch dargestellt. **B:** Einstromwerte der Zellen aus A, gemittelt über alle Messtage. **C:** Mittlere Stromdichte von Jurkat-T-Zellen, behandelt wie in A nach vollständiger Entwicklung von I_{CRAC} . **D:** Stabil HA-Orai1_{WT} (WT) exprimierende Jurkat-T-Zellen wurden lysiert, über α -HA-Agarose aufgereinigt, die Proteine der einzelnen Fraktionen gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit α -HA und α -Galektin-3 detektiert. **E:** Stabil HA-Orai1_{WT} (WT) bzw. HA-Orai1_{N223A} (N223A) exprimierende Jurkat-T-Zellen wurden aufgereinigt, aufgetrennt und geblottet wie in D. Die Detektion erfolgte mit α -HA sowie α -Galektin-9 und -1.

4.10 Regulation der Expression von Orai1 und Orai3

Neben potentiellen Glykosylierungsstellen unterscheiden sich Orai1 und Orai3 auch in Bezug auf ihre Redox-Sensitivität. Während die Oxidation bestimmter Cysteine die Kanalaktivität von Orai1 beeinflussen kann, sind diese Cysteine und damit auch die vermittelte Redox-Sensitivität bei Orai3 nicht vorhanden. Redox-Sensitivität spielt vor allem in entzündetem Gewebe eine Rolle, wo dem Orai1/Orai3-Verhältnis somit eine wichtige, regulierende Funktion bei der Aktivität von Immunzellen zukommt.

4.10.1 Die Promotoraktivität von Orai1 und Orai3

Orai1 und Orai3 werden in vielen Zelltypen (wie hier am Beispiel von HEK293-Zellen gezeigt) unterschiedlich stark exprimiert (s. Abb. 33A). Da die Stärke der Expression unter anderem über die jeweilige Promotoraktivität vermittelt wird, wurde die Stärke der Promotoraktivität von Orai1 und Orai3 in verschiedenen Zellsystemen untersucht. Dazu wurden jeweils 1000 bp aus dem 5'-Bereich von Orai1 und Orai3 vor das Luciferase-Gen des dualen Vektors pMIR_TK-RNLØCMV kloniert. Dieser exprimiert als zweites Reporter-Gen Renilla-Luciferase unter der Regulation eines TK-Promotors und erlaubt damit eine interne Normierung (s. Abb. 12).

Gemessen am relativen Luciferaseaktivitätsquotienten ($\text{Rel. } \frac{\text{LucFf}}{\text{LucRen}}$) war die Aktivität des Orai1-Promotors in HEK293-Zellen tendenziell stärker als die des Orai3-Promotors. In SKMEL5-Zellen hingegen, war das Verhältnis genau umgekehrt. Ein signifikanter Unterschied in der Promotoraktivität konnte jedoch in keinem der beiden Zellsysteme detektiert werden (s. Abb. 33B). Dabei entsprachen die mRNA-Level von Orai1 und Orai3 in HEK293-Zellen in etwa den Promotoraktivitäten, während die mRNA-Level (vergleiche [Stanisz et al., 2014]) und Promotoraktivitäten von Orai1 und Orai3 in SKMEL5-Zellen genau die gegenläufige Tendenz zeigten.

4.10.2 Einfluss von miRNAs auf die Expression von Orai3

Neben der Promotoraktivität hat auch die Stabilität der mRNA-Transkripte und die Translationeffizienz einen wichtigen Einfluss auf die Menge an synthetisiertem Protein. Da die Promotoraktivitäten von Orai1 und Orai3 in etwa gleich zu sein schienen, wurde im nächsten Schritt der Einfluss potentiell bindender miRNAs auf die Stabilität bzw. Translationeffizienz der Orai3-mRNA untersucht. Hierzu wurden die ersten 300 bp der Orai3-3'UTR bzw. die komplette Orai3-3'UTR in den Vektor pMir_TK-RNL kloniert (s. Abb. 10).

Zunächst mussten die im Rahmen dieser Arbeit klonierten miRNA-Expressionsvektoren auf korrekte Expression der einzelnen miRNAs getestet werden. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit den entsprechenden pSG5-Expressionsvektoren bzw. dem pSG5-Leervektor (LV) (Abb. 11) transfiziert und nach 48 h lysiert. Die miRNAs in den Lysaten wurden über Northern-Blot mittels radioaktiv markierter Sonden nachgewiesen. Hsa-miR-375 diente

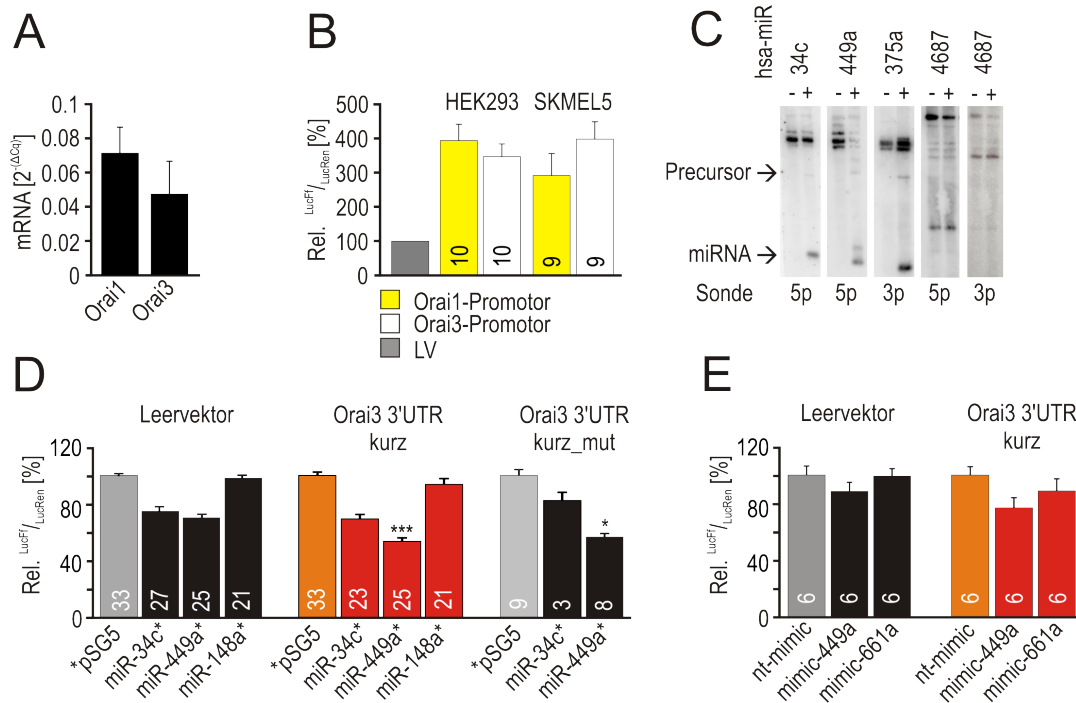


Abbildung 33: Die Promotorstärken von Orai1 und Orai3 und der Einfluss von miRNAs auf die Expression Orai3-3'UTR-gekoppelter Gene. **A:** mRNA-Level von Orai1 und Orai3 in HEK293-Zellen (n=4). **B:** Luciferaseaktivitätsquotient von Firefly- und Renilla-Luciferase ($\text{LucFf}/\text{LucRen}$) normiert den pSG5-Leervektor (LV) gemessen mittels Dual Glow Luciferase Reporter Assay System in Lysaten von HEK293-/ SKMEL5-Zellen, die mit dem Leervektor pMIR_TK-RNLØCMV (LV; grau) bzw. dem Promotor für Orai1 (Orai1-Promotor; gelb) oder Orai3 (Orai3-Promotor; weiß) in pMIR_TK-RNLØCMV transfiziert wurden. **C:** Expression der entsprechenden miRNAs nach Transfektion von HEK293T-Zellen mit pSG5-LV (-) oder pSG5 mit integrierter miRNA-Sequenz (+), detektiert nach RNA-Isolation, gelelektrophoretischer Auftrennung und Northernblot mit den entsprechenden Sonden gegen den 3p- oder 5p-Strang (in Kooperation mit Dr. Martin Hart, AG Gräßer, Institut für Virologie, Universität des Saarlandes). **D:** $\text{LucFf}/\text{LucRen}$ normiert auf die LV-Kntrl. (pSG5; entsprechender Luciferase-Reportervektor + pSG5-LV) gemessen mittels Dual Glow Luciferase Assay System in Lysaten von HEK293T-Zellen, die mit den entsprechenden Luciferase-Reportervektoren (Leervektor pMIR_TK-RNL bzw. Orai3-3'UTR kurz und Orai3 3'UTR kurz_mutiert in pMIR_TK-RNL) und den entsprechenden miRNA-Expressionsvektoren (Leervektor pSG5 bzw. den miRNA-Sequenzen von hsa-miR-34c, hsa-miR-449a sowie hsa-miR-148a in pSG5) transfiziert wurden. **E:** $\text{LucFf}/\text{LucRen}$ normiert auf die non-targeting-Kontrolle (nt-mimic; entsprechender Luciferase-Reportervektor + non targeting (nt) -mimic) gemessen mittels Dual Glow Luciferase Assay System in Lysaten von HEK293T-Zellen, die zunächst mit den entsprechenden miRNA-mimics (nt-mimic und mimics analog zu hsa-miR-449a sowie hsa-miR-661a) und 4 h später mit den entsprechenden Luciferase-Reportervektoren (Leervektor pMIR_TK-RNL bzw. Orai3 3'UTR kurz in pMIR_TK-RNL) transfiziert wurden. Die Anzahl der ausgewerteten Transfektionen ist in den jeweiligen Abbildungen angegeben.

dabei als Positivkontrolle. Neben hsa-miR-34c und -449a, die potentielle Zielsequenzen in der 3'UTR von Orai3 aufweisen, wurde auch die Expression von hsa-miR-4687 getestet. Diese miRNA war wegen ihrer Kodierung im 5'Bereich von STIM1 besonders interessant.

Während für hsa-miR-34c und -449a die Expression der miRNAs gezeigt werden konnte, konnte die Expression der putativen miRNA, deren Sequenz in der 5'UTR von STIM1 kodiert ist, weder für den 3p- noch 5p-Strang nachgewiesen werden (s. Abb. 33C). Es kann davon ausgegangen werden, dass die entsprechende miRNA entgegen der Datenbankprognosen nicht aus der angegebenen Sequenz exprimiert wird.

Die Einflüsse der einzelnen miRNAs wurden zunächst auf einen kürzeren Abschnitt (Orai3 3'UTR kurz = 356 bp, 1 Bindestelle für jede getestete miRNA, vergl. Abb.10) der Orai3-3'UTR getestet. Eine Destabilisierung oder auch Stabilisierung bzw. eine Änderung der Translationseffizienz der 3'UTR sollte bei Expression aus dem verwendeten Luciferase-Reportervektor pMir_TK-Ren zu einer verringerten oder erhöhten Synthese der Firefly-Luciferase und damit auch einem verminderten/erhöhten Luciferaseaktivitätsquotienten ($^{LucFf}/_{LucRen}$) führen.

Der Luciferaseaktivitätsquotient $^{LucFf}/_{LucRen}$ unter dem Einfluss einzelner miRNAs wurde dabei immer relativ zum Einfluss des pSG5-LV (exprimiert keine miRNA) auf das entsprechende Reporterkonstrukt (pMIR_TK-Ren mit 3'UTR oder pMIR_TK-Ren-LV) betrachtet.

Als Kontrolle für die spezifische Bindung der miRNAs, wurde der Einfluss der miRNAs auch auf Luciferase-Reportervektor-Konstrukte getestet, die zwar die getestete Orai3-3'UTR hinter dem Luciferase-Gen exprimieren, zudem aber mehrere Basenaustausche in der putativen miRNA-Bindestelle enthalten, die eine Bindung der miRNA verhindern sollten.

Auch ohne angehängte 3'UTR wird durch viele miRNAs eine Herunterregulation des relativen Luciferaseaktivitätsquotienten verursacht. Daher muss der Einfluss der miRNA auf den relativen Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors mit integrierter 3'UTR mit dem Einfluss der miRNA auf den relativen Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors ohne integrierte 3'UTR (pMir_TK-RNL-LV) verglichen werden. Erst wenn hier ein signifikanter Unterschied auftritt, kann man von einem signifikanten Einfluss der miRNA auf die Stabilität/Translationseffizienz der Orai3-3'UTR-konjugierten mRNA sprechen. Sowohl die Koexpression von hsa-miR-449a wie auch hsa-miR-34c führten zu einer fast 30%igen Herunterregulation des relativen Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors ohne integrierte 3'UTR.

Nur hsa-miR-449a zeigte einen signifikant stärker vermindernenden Einfluss auf den relativen Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors mit integrierter 3'UTR (Orai3-3'UTR kurz), als auf den relativen Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors ohne integrierte 3'UTR.

Bei Koexpression von hsa-miR-449a und hsa-miR-34c in Kombination mit dem Luciferase-Reportervektor mit integrierter Orai3-3'UTR mit mutierter Bindestelle (Orai3 3'UTR

kurz_mutiert) wurde die Verminderung des relativen Luciferaseaktivitätsquotienten durch hsa-miR-449a allerdings nicht vollständig aufgehoben (s. Abb. 33D).

Da die Verminderung des relativen Luciferaseaktivitätsquotienten durch hsa-miR-449a durch Mutation der Bindestelle nicht eindeutig aufgehoben werden konnte, blieben Zweifel an der Spezifität der miRNA bestehen. Daher wurde ein zweites Modell zur Expression der miRNA eingesetzt. Dabei wurden die Zellen zunächst mit kommerziell erworbenen miRNA-mimics und 4 h später mit den entsprechenden Luciferase-Reportervektoren transfiziert. Neben der miRNA-mimic analog zu hsa-miR-449a wurde zusätzlich die miRNA-mimic analog zu hsa-miR661a eingesetzt. Auch die miR661a-analoge mimic, war durch Datenbanksuche als möglicher Kandidat für eine translationsvermindernde Bindung an die Orai3-3'UTR identifiziert worden.

Auch die mimic analog zu hsa-miR-449a zeigte einen stärker vermindernenden Einfluss auf den relativen Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors mit integrierter 3'UTR (Orai3-3'UTR kurz), als auf den relativen Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors ohne integrierte 3'UTR. Ähnlich wie die über pSG5 exprimierte miRNA, hatte aber auch die hsa-miR-449-analoge mimic einen vermindernenden Einfluss auf den relativen Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors ohne integrierte 3'UTR. Auch die hsa-miR-661a-analoge mimic zeigte einen stärker vermindernenden Einfluss auf den relativen Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors mit integrierter 3'UTR, als auf die Luciferaseaktivität des Luciferase-Reportervektors ohne integrierte 3'UTR. Im Gegensatz zur hsa-miR-449a-analogen mimic hatte die hsa-miR-661-analoge mimic aber keinen vermindernenden Einfluss auf den relativen Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors ohne integrierte 3'UTR (s. Abb. 33E).

Um den Beitrag weiterer miRNA-Bindestellen in der Orai3-3'UTR zu testen, aber auch um die bereits erworbenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde der translationsvermindernde Einfluss der getesteten miRNAs auch in Zusammenhang mit der kompletten 3'UTR von Orai3 (Orai3 3'UTR lang = 1137 bp, 2 Bindestellen für jede getestete miRNA (vergl. Abb.10) untersucht.

Auch auf die komplette Orai3-3'UTR zeigten die getesteten miRNAs einen vergleichbaren Effekt, wie auf die kürzere Orai3-3'UTR. Die Koexpression von hsa-miR-449a führte schon nach wenigen Messungen zu einer signifikanten Verminderung des relativen Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors mit integrierter 3'UTR im Vergleich zum Luciferase-Reportervektor ohne integrierte 3'UTR. Die Expression von hsa-miR-34c und hsa-miR-148a hingegen hatte keinen Einfluss auf den relativen Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors mit integrierter 3'UTR im Vergleich zum Luciferase-Reportervektor ohne integrierte 3'UTR. (s. Abb. 34A).

Neben der Verwendung von Luciferase-Assays wurde auch versucht, einen möglichen destabilisierenden Einfluss der hsa-miR-449a auf die Orai3-3'UTR auf mRNA-Ebene für endogenes Orai3 zu zeigen (qRT-PCR).

Der Einfluss von hsa-miR-449a auf das mRNA-Level von Orai3 wurde zunächst in

HEK293T-Zellen untersucht, da diese in Kombination mit pSG5 eine höhere Expression der transfizierten DNA ermöglichen. Generell zeigten HEK293T-Zellen auf mRNA-Level eine niedrige endogene Expression von Orai3, wobei die Überexpression von hsa-miR-449a zu einem tendenziellen Anstieg des Orai3-mRNA-Levels führte. Wegen des niedrigen endogenen Orai3-mRNA-Levels in HEK293T-Zellen wurden die Messungen auch in HEK293-Zellen wiederholt. Bei Überexpression von hsa-miR-449a in HEK293-Zellen wurde tendenziell ein reduziertes, allerdings nicht signifikant niedrigeres mRNA-Level von Orai3 gemessen (s. Abb. 34B).

Neben dem Einfluss von miRNAs normiert auf den Einfluss des leeren miRNA-Expressionsvektors (pSG5-LV), wurden auch die absoluten Firefly- /Renilla-Luciferase-Quotienten ($\text{LucFf}/\text{LucRen}$) analysiert. Um den Einfluss endogener miRNAs zu detektieren, wurden dabei HEK293T-Zellen mit dem leerem Luciferase-Reportervektor (pMir_TK-RNL-LV) bzw. dem Luciferase-Reportervektor mit integrierter Orai3-3'UTR (Orai3 3'UTR kurz in pMir_TK-Ren) transfiziert.

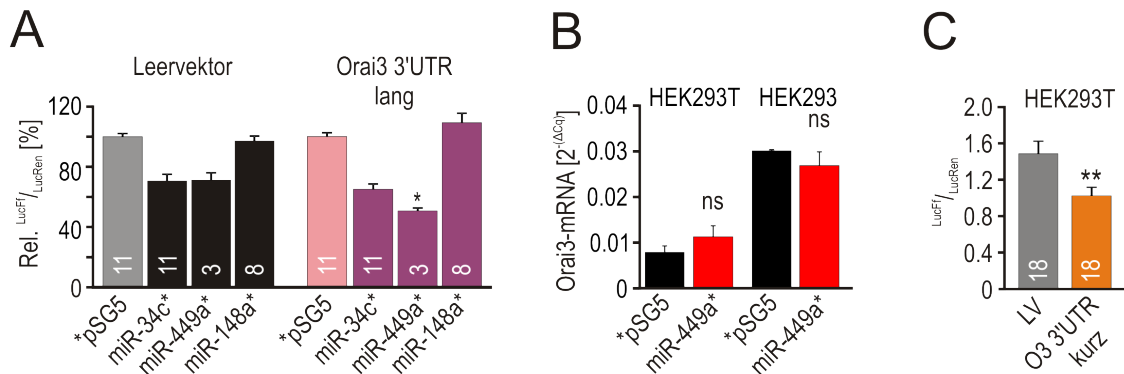


Abbildung 34: Einfluss von miRNAs auf die Expression von Orai3 und Orai3-3'UTR-gekoppelter Gene. **A:** Luciferaseaktivitätsquotient von Firefly- und Renilla-Luciferase ($\text{LucFf}/\text{LucRen}$) normiert auf die Leervektor (LV) -kontrolle (pSG5; entsprechender Luciferase-Reportervektor + pSG5-LV) gemessen mittels Dual Glow Luciferase Assay System in Lysaten von HEK293T-Zellen, die mit den entsprechenden Luciferase-Reportervektoren (Leervektor pMIR_TK-RNL bzw. Orai3 3'UTR lang in pMIR_TK-Ren) und den miRNA-Expressionsvektoren (Leervektor pSG5 bzw. Sequenzen von hsa-miR-34c, hsa-miR-449a, hsa-miR-148a in pSG5) transfiziert wurden. **B:** mRNA-Level von Orai3 in HEK293T- und HEK293-Zellen die 48 h vor Ernte mit dem Leervektor pSG5 (pSG5; schwarz) bzw. hsa-miR-449a im Expressionsvektor pSG5 (miR-449a; rot) transfiziert wurden. **C:** $\text{LucFf}/\text{LucRen}$ gemessen mittels Dual Glow Luciferase Assay System in Lysaten von HEK293T-Zellen, die mit dem Leervektor pMIR_TK-RNL (LV; grau) bzw. Orai3 3'UTR kurz in pMIR_TK-RNL (O3 3'UTR kurz; orange) transfiziert wurden. Die Anzahl der ausgewerteten Transfektionen ist in den jeweiligen Abbildungen angegeben.

Beim Vergleich des Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors mit integrierter Orai3-3'UTR (Orai3 3'UTR kurz in pMir_TK-Ren) und des Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors ohne integrierte UTR (pMir_TK-Ren-LV), zeigte sich eine signifikante Reduzierung des Luciferaseaktivitätsquotienten in Zellen transfiziert mit dem Luciferasevektor mit integrierter Orai3-3'UTR. (s. Abb. 34C).

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Validierung der Glykosylierung von Orai1

Orai1 ist ein N-glykosyliertes Protein.

Orai1 ist die essentielle Ionenkanal-bildende Untereinheit von I_{CRAC} [Prakriya et al., 2006] [Feske et al., 2006] [Vig et al., 2006b]. Während Orai1 im Gegensatz zu seinen Homologen Orai2 und Orai3 bereits als Glykoprotein nachgewiesen werden konnte [Gwack et al., 2007], verblieb die funktionelle Rolle der N-glykosidischen Modifikation von Orai1 bislang unklar.

Bezüglich des relativen Molekulargewichtes von posttranslational modifiziertem Orai1 bestehen in der Literatur signifikante Diskrepanzen. Vor allem in Westernblots aus primären Geweben konnte bislang kein einheitlich diskretes Molekulargewicht von Orai1 festgestellt werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher zunächst die Glykosylierung von Orai1 in verschiedenen Zellsystemen mittels Westernblot nachgewiesen und verglichen.

Eine vollständige Unterbindung der Glykosylierung von Orai1 wurde durch die Basenaustausch-Mutation des Glykan tragenden Asparagins (N223) gegen Alanin (A) erreicht, wobei ein HA-markiertes Konstrukt der Glykosylierungsmutante Orai1_{N223A} (HA-Orai1_{N223A}) und ein HA-markiertes Konstrukt der Wildtypform (HA-Orai1_{WT}) jeweils zur Generierung einer stabilen Jurkat T-Zelllinie genutzt wurden. Lysate beider Zelllinien wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Synthese-Produkte der stabil integrierten Gene mittels α -HA-Antikörper (α -HA) im Westernblot nachgewiesen.

Dabei ließ sich in den HA-Orai1_{N223A} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen ein einziges Produkt bei ~ 37 kDa detektieren, während in den HA-Orai1_{WT} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen zwei Produkte bei ~ 35 kDa und ~ 50 kDa detektiert werden konnten (s. Abb. 13A). Da HA-Orai1_{N223A} stabil exprimierende Jurkat-T-Zellen nur unglykosyliertes HA-markiertes Orai1 synthetisieren können, muss es sich bei dem Produkt mit dem Molekulargewicht von ~ 35 kDa um die unglykosylierte Form von Orai1 handeln (was auch dem errechneten, theoretischen Molekulargewicht entspricht). Das zweite Produkt mit

~ 50 kDa, welches in den HA-Orai1_{WT} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen nachgewiesen werden konnte, sollte demnach eine oder mehrere der glykosylierten Versionen des Orai1-Proteins repräsentieren.

Die Synthese von Orai1 nur mit basaler Glykosylierung wurde durch die Expression in CHO_{Lec}-Zellen ermöglicht. Beim Vergleich mit CHO_{WT}-Zellen konnte auch in CHO_{Lec}-Zellen die unglykosylierte Form (~ 35 kDa), sowie eine basal glykosylierte Form (~ 37 kDa) bestimmt werden. CHO_{WT}-Zellen hingegen synthetisierten mehrere Orai1-Produkte mit einem Molekulargewicht von ~ 50 kDa, die nach Tunicamycin-Behandlung nicht mehr detektierbar waren und so als Glykosylierungs-Produkte von Orai1 identifiziert werden konnten (s. Abb. 13B).

Da sowohl fremde Arbeiten [Fukushima et al., 2012] wie auch eigene Ergebnisse (vergl. Abb. 15D) auf die Existenz eines alternativen Start-Codons für die Synthese von Orai1 hindeuten, ist denkbar, dass ein Teil der Orai1 spezifischen Banden auf verkürzte Transkripte von Orai1 zurückzuführen sind und auch glykosylierte Produkte des verkürzten Transkriptes enthalten. Die wenigen Glykosylierungs-Produkte von Orai1, die auch nach Tunicamycin-Behandlung zu erkennen waren, zeigten die gleichen Molekulargewichte und quantitative Verteilung wie im Wildtyp. Ob es sich dabei um das Ergebnis einer unvollständigen Inhibition handelte, oder Protein, das auf Grund eines entsprechend langsamen *turnover* bereits vor dem Beginn der Tunicamycin-Behandlung vorhanden war, lässt sich an dieser Stelle nicht abschließend klären.

Im Gegensatz zu Orai1 waren beim Nachweis von STIM1 kaum Unterschiede zwischen der Expression in CHO_{WT}- und CHO_{Lec}-Zellen detektierbar. Nur durch Gelelektrophorese mit niedriger Quervernetzung zur optimalen Analyse größerer Proteine konnte ein geringfügig geringeres Molekulargewicht für STIM1 bei Expression in CHO_{Lec}-Zellen verglichen mit CHO_{WT}-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 13C). Wie bereits von Kilch et al. gezeigt werden konnte, scheint STIM1 also lediglich einer basalen Glykosylierung unterworfen zu sein [Kilch et al., 2013], die wegen dem unterschiedlich hohen Molekulargewicht bei Expression in CHO_{WT}- und CHO_{Lec}-Zellen jedoch über den High-Mannose-Typ hinausgehen und aus mehr als den 5 Mannose-Resten bestehen muss, auf die die N-Glykosylierung in der Lec-Mutante beschränkt ist.

Auch für endogen in Jurkat-T-Zellen exprimiertes Orai1 konnte durch den Vergleich von PNGase F behandelten und unbehandelten Lysaten unglykosyliertes und glykosyliertes Orai1-Protein nachgewiesen werden (s. Abb. 13D). Da PNGase die Verbindung zwischen N-Glucosamin und Asparagin des entsprechenden Proteins hydrolysiert und damit das komplette Glykan ablöst [Maley et al., 1989], ist nicht eindeutig zu klären, wieso Orai1 nach PNGase-Behandlung als Doppelbande erschien, da nur die Verbindung zwischen α 1-3-fucosylierten N-Glucosaminen und Asparagin von PNGase F nicht gelöst werden kann und diese Verbindung normalerweise nur in Pflanzen und Insekten vorkommt [Tretter et al., 1991]. Wahrscheinlicher ist eine weitere posttranslationale Modifikation von Orai1 wie Phosphorylierung oder Methylierung [Ryšlavá et al., 2013], eine alternative Splice-Variante

oder ein alternatives Translationsprodukt, wobei Phosphorylierung und das abweichende Molekulargewicht der phosphorylierten Form von Orai1 bereits in der Literatur gezeigt werden konnten [Shaw et al., 2012].

Die Spezifität des α -Orai1 Antikörpers (α -Orai1) wurde neben der PNGase-Behandlung auch mittels siRNA vermittelter Herunterregulation von Orai1 gezeigt. Diese führte zur Reduktion der Bandenintensität aller mit α -Orai1 detektierten Banden, die demnach spezifisch für Orai1 sind (s. Abb. 13E).

Im Gegensatz zum Nachweis von HA-Orai_{WT} mit α -HA, wobei nur ein einziges distinktes Glykosylierungs-Produkt detektiert werden konnte, wurden beim Nachweis von Orai1 in unbehandelten Jurkat-T-Zellen mit α -Orai1 mehrere Produkte detektiert. Da die Überexpression von Orai1 in CHO_{WT}-Zellen auch mehrere Glykosylierungs-Produkte hervorbrachte, scheint die Überexpression selbst nicht der Grund für die vermeintlich einheitliche Glykosylierung zu sein. Möglicherweise wird die Antigenität der HA-Markierung durch die Glykosylierung beeinflusst, sodass bestimmte Glykosylierungs-Produkte durch den α -HA Antikörper bevorzugt erkannt werden. Daher sollte gegebenenfalls auch eine mögliche Beeinflussung der Antikörperspezifität bei der Beurteilung densitometrischer Bestimmungen von Proteinkonzentrationen im Westernblot beachtet werden.

Zusammengefasst konnte eindeutig gezeigt werden, dass sowohl endogenes wie auch bei Überexpression synthetisiertes Orai1 an Position N223 glykosyliert wird. Dabei entstand eine heterogene Mischung unterschiedlich glykosylierter Produkte, die im Durchschnitt etwa das 1,5-fache Molekulargewicht von unglykosyliertem Orai1 aufwiesen. Die Glykosylierung konnte mit verschiedenen Methoden unterbunden werden, wobei die Synthese von Orai1 nur mit *core*-Glykosylierung durch Expression in Glykosyltransferase-defizienten Zellen möglich war.

Durch die Behandlung mit PNGase konnte Orai1 fast vollständig deglykosyliert werden. Die Behandlung mit Tunicamycin erwies sich bezüglich ihrer deglykosylierenden Wirkung in CHO-Zellen als weniger effektiv, da auch nach Behandlung mit Tunicamycin über 24 h Reste von glykosyliertem Orai1 nachweisbar waren. Da die Behandlung mit Tunicamycin aber nur die Glykosylierung neu synthetisierter Proteine verhindert, wurden die nachgewiesenen Reste von glykosyliertem Orai1 vermutlich vor der Behandlung mit Tunicamycin synthetisiert. Die Behandlung lebender Zellen mit PNGase, deren Effektivität bereits in CHO-Zellen gezeigt werden konnte [Noma et al., 2009], wäre hier eine mögliche Alternative.

Auch bei der Überexpression der Glykosylierungs-Mutante Orai_{N223A} muss endogen exprimiertes Orai1 berücksichtigt werden, dessen Synthese-Produkte nach wie vor glykosyliert werden können. Der relative Anteil endogen exprimierter Orai1-mRNA könnte dabei durch zusätzliche Transfektion mit siRNA gerichtet gegen die 3'UTR von endogenem Orai1 vermindert werden.

5.2 Der Einfluss einer Deglykosylierung auf SOCE und I_{CRAC}

Die komplette Deglykosylierung mit Tunicamycin hat einen zelltypspezifischen Einfluss auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE).

Die signifikante Verstärkung des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms nach Behandlung mit Tunicamycin, die bereits in Jurkat-T-Zellen gezeigt werden konnte [Czyż et al., 2009], ließ sich nicht in allen naiven Zellen und Zelllinien reproduzieren (s. Abb. 14). Dabei steht die Tunicamycin-induzierte potentielle Verstärkung möglicherweise auch in Zusammenhang mit dem STIM1/Orai1-Verhältnis, da die Verstärkung von SOCE in Zelltypen mit einer hohen STIM1/Orai1-Expression eine höhere Signifikanz aufwies.

Eine Deglykosylierung von adhärennten Zellen wirkt sich zudem auch auf die oftmals glykosylierten Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesion molecules = CAM) [Gu et al., 2012] aus. Dadurch werden nicht nur Morphologie der Zelle, sondern möglicherweise auch CAM-abhängige Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst [Sheng et al., 2013]. Es ist denkbar, dass auch solche Effekte glykosylierungs-bedingte Erhöhungen des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms verhindern oder verdecken könnten.

Zudem ist die Glykosylierung enzymatisch sowie von der Substratverfügbarkeit reguliert und hängt deshalb stark von der biochemischen Umgebung und dem Zelltyp ab. Schon Unterschiede in der Zellkultur selbst können die biochemische Umgebung der Zellen ändern und so die Oberflächenglykosylierung und damit eine Glykosylierungs-abhängige Modulation beeinflussen [Christiansen et al., 2014].

Eine Erhöhung des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms durch Tunicamycin erlaubt zudem noch keine unmittelbaren Rückschlüsse auf einen direkten Einfluss der Orai1-Deglykosylierung auf SOCE. Neben der Deglykosylierung von STIM1 oder STIM2 könnte SOCE auch über die Deglykosylierung von SOCE-Modulatoren wie TRPC1 [Cheng et al., 2013] [Beech et al., 2003] verändert werden. Darüber hinaus hätte auch eine veränderte Aktivität von deglykosylierbaren Plasmamembranpumpen wie dem Natrium-Kalzium-Austauscher NCX (Na^+/Ca^{2+} exchanger) (vergleiche www.uniprot.org für potentielle Glykosylierungsstellen) einen Einfluss auf den Ca^{2+} -Gradienten über die Plasmamembran [Clapham, 2007] und damit indirekt auch auf SOCE.

Durch die Tunicamycin vermittelte Inhibierung der N-Glykosylierung wird im ER außerdem ein Prozess initiiert der als UPR (unfolded protein response) bezeichnet wird und zu einer verstärkten Expression von Proteinen führt, die an der Proteinfaltung und -reifung beteiligt sind [Bull and Thiede, 2012]. Ein direkter Einfluss der UPR auf die Expression von SOCE-Regulatoren konnte bereits am Beispiel von Stanniocalcin 2 gezeigt werden. Dessen verstärkte Expression nach Tunicamycin-Behandlung führt allerdings zu einer Verminderung des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms [Zeiger et al., 2011] und kann den hier gezeigten Effekt nicht erklären. Dass von der veränderten Regulation im Rahmen der UPR weitere Komponenten und Regulatoren von SOCE betroffen sein könnten, sollte jedoch nicht ausgeschlossen werden. Auch eine Beeinflussung von SOCE-Komponenten

und -Regulatoren durch die UPR verstärkt induzierte Proteinfaltung und -reifung bleibt darüber hinaus denkbar.

5.3 Charakterisierung der Glykosylierung von Orai1

Die Glykosylierung von Orai1 ist zelltypspezifisch.

Zelltypspezifische Unterschiede fanden sich auch in Form verschiedener Orai1-Glykosylierungsprodukte bei Westernblot-Analysen (s. Abb. 15C). Diese ließen sich durch PNGaseF-Verdau entweder auf eine einzelne Bande oder auf eine Doppelbande bei ~ 35 kDa reduzieren (s. Abb. 15D), wobei die obere Bande der Doppelbande vermutlich durch die phosphorylierte Form von Orai1 gebildet wurde (s.o.).

Durch die PNGase-Behandlung konnte gezeigt werden, dass es sich bei allen mit α -Orai1 nachgewiesenen Banden um spezifische Glykosylierungs-Produkte von Orai1 handelt. Zusätzlich bestätigte dieses Experiment auch die bereits von Stanisz et al. mittels siRNA nachgewiesene Spezifität des verwendeten Antikörpers [Stanisz et al., 2014].

Da die Anzahl der unterschiedlichen Orai1-verknüpften Glykane zwischen ~ 2 (WM3734) und ~ 8 (HMC1.2 und Raji) lag, wurde zusätzlich zur Zelltypspezifität auch die Mikroheterogenität der Orai1-Glykosylierung deutlich. Orai1 scheint also nicht an ein einziges Glykan von definierter Zusammensetzung, sondern je nach Zelltyp an mehrere bis viele unterschiedliche Glykane gebunden zu sein.

Nach PNGase Behandlung war zusätzlich zur Bande bei ~ 35 kDa (was dem errechneten Molekulargewicht von Orai1 entspricht) auch noch eine Bande bei ~ 23 kDa zu erkennen, bei der es sich vermutlich um ein verkürztes, alternatives Translations-Produkt von Orai1 handelt, dessen Translation an einem alternativen Startmethionin an Position 64 oder 71 startet [Fukushima et al., 2012].

Berücksichtigt man, dass auch das alternative Translationsprodukt von Orai1 theoretisch glykosyliert werden kann, ist anzunehmen, dass ein Teil der Orai1-Glykosylierungsprodukte auf verkürztem Orai1 basieren. Dies würde auch die Doppelbande bei ~ 50 kDa erklären, die vor allem bei T-Zellen (CD4, CD8 und Jurkat) sowie SKMEL-Zellen von höherer Intensität ist als alle anderen Banden. Sie repräsentiert möglicherweise Vollängen-Translations-Produkt und verkürztes Translations-Produkt, jeweils gekoppelt an das gleiche „Haupt“-Glykan, das von allen möglichen Glykanen am häufigsten synthetisiert wird. Funktionelle Unterschiede zwischen den beiden Translations-Produkten konnten bisher nicht gezeigt werden [Fukushima et al., 2012].

Neben dem Effekt auf SOCE (funktioneller Effekt) konnte der Effekt von Tunicamycin auch im Westernblot durch Änderungen des relativen Anteils glykosylierter Orai1-Produkte am Orai1-Gesamtprotein detektiert werden (quantitative Deglykosylierung) (vergl. Abb. 15E-H).

Dabei korrelierte die Stärke des funktionellen Effektes nicht mit der Stärke der quantitativen Deglykosylierung. In naiven CD4-Zellen zeigte die Behandlung mit Tunicamycin

in der Westernblot-Analyse die geringste quantitative Deglykosylierung und bei Imaging-Messungen von SOCE den größten funktionellen Effekt. In SKMEL5- und WM3734-Zellen war bei geringen funktionellen Effekten eine deutlich stärkere quantitative Deglykosylierung zu messen. Diese stärkere quantitative Deglykosylierung konnte in naiven CD4-Zellen auch nach doppelter Inkubationsdauer nicht erreicht werden.

Die deutlich geringere Proliferation von naiven CD4-Zellen und damit auch geringeres Protein-*Turnover* kann die unterschiedliche Effektstärke auf Ebene der quantitativen Deglykosylierung erklären, jedoch nicht in Kombination mit den gegenläufigen funktionellen Effekten. Möglicherweise wird ein maximaler funktioneller Effekt bei Deglykosylierung mittels Tunicamycin nicht durch eine maximale, sondern prozentual eher geringfügige Deglykosylierung erreicht. Alternativ ist es auch möglich, dass der Effekt über Glyko-Strukturen vermittelt wird, die wegen ihrer Größe oder Quantität oder aufgrund des verwendeten Antikörpers auf Westernblot-Ebene schwer nachweisbar sind.

5.4 Die Sialylierung von Orai1

Orai1 ist sialyliert.

Für eine erste Charakterisierung der komplexen Glykosylierung von Orai1 wurde die Affinität von aufkonzentriertem Orai1-Protein für drei verschiedene Sialylsäure-bindende Lektine getestet. Dabei wurde die Sialylierung von Orai1 über die Retention an MAL, SNA und WGA nachgewiesen (s. Abb. 16A-B). Die relative Retinierung ermöglicht dabei keine quantitative Aussage über entsprechende Glykan-Motive, da sich die Bindungsaffinität der einzelnen Lektine nicht vergleichen lässt. Da WGA auch endständige N-Acetylglucosamin-Reste bindet [Harduin-Lepers et al., 2012], müsste seine Spezifität zusätzlich durch Sialidase-Behandlung überprüft werden. Qualitativ zeigt die Bindung an SNA und MAL aber eindeutig, dass Orai1 endständige Sialylsäuren besitzt, die entweder α -2-3- oder α -2-6-glykosidisch verknüpft sind.

Durch erneute Validierung mit Agarose-*Bead*-gekoppelten SNA- und MAH-Lektinen (s. Abb. 16C) konnte die Sialylierung als Ergebnis der ersten Charakterisierung bestätigt werden. Entsprechend der Ergebnisse PNGase F-Verdaus, wonach es sich bei der Glykosylierung von Orai1 ausschließlich um ein N-glykosidisch verknüpftes Glykan handelt, bestätigt auch die fehlende Bindung an MAH in Abbildung , dass die Sialylierung von Orai1 nicht an einem O-verknüpften Glykan erfolgt. Auch wenn sialylierte Proteine im Westernblot theoretisch mit biotinylierten SNA-Lektinen nachgewiesen werden können (s. Abb. 16D-E), ließ sich aufgereinigtes Orai1 nicht auf diese Weise detektieren (s. Abb. 17A). Der Grund lag vermutlich in der unzureichenden Proteinmenge, die jedoch das Maximum dessen darstellte, was mit der verwendeten Aufkonzentrierung im Westernblot eingesetzt werden konnte. Hier wären Sialylsäure-spezifische Antikörper, wie sie auch für die Tumorforschung eingesetzt werden [Harduin-Lepers et al., 2012], eine mögliche Alternative, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch noch nicht getestet wurde.

5.4.1 Die Rolle von ST6Gal1

ST6Gal1 ist an der Glykosylierung von Orai1 beteiligt.

Nachdem die Sialylierung von HA-Orai1_{WT} über die Aufreinigung mit SNA-gekoppelten *Beads* bestätigt werden konnte, wurden HA-Orai1_{WT} stabil exprimierende Jurkat-T-Zellen, die entweder mit ns-siRNA oder siRNA gegen ST6Gal1 behandelt worden waren, bezüglich ihrer SNA-Retention quantitativ verglichen (s. Abb. 17B). Da mit siRNA gegen ST6Gal1 behandelte Zellen eine geringere Retention aufwiesen, konnte zum Einen die Spezifität von SNA-*Beads* für sialyliertes Protein gezeigt und zum Anderen die Beteiligung von ST6Gal1 an der Glykosylierung von Orai1 nachgewiesen werden. Da die relative Retention von Orai1 an SNA-*Beads* durch die siRNA vermittelte Herunterregulation von ST6Gal1 etwa in gleichem Umfang reduziert wurde, wie ST6Gal1 auf Protein-Level (s. Abb. 18C), liegt die Vermutung nahe, dass die Sialylierung von Orai1 hauptsächlich durch ST6Gal1 katalysiert wird.

5.4.2 Die Sialylierung in verschiedenen Zelltypen

Der Grad an endständiger α -2-6-Sialylierung ist zelltypabhängig.

Beim Vergleich der SNA-Bindungsaffinität zwischen verschiedenen Zelltypen ließen sich ebenfalls zelltypspezifische Unterschiede feststellen (s. Abb. 17C-D). Auch die Sialylierung von Orai1 scheint also variabel zu sein und könnte ebenfalls zelltypspezifische Unterschiede im funktionellen Einfluss einer Deglykosylierung erklären. Interessanterweise ist der Grad der Sialylierung von Orai1 in primären Immunzellen deutlich höher, als in der entsprechenden Jurkat-T-Krebszelllinie - in Kontrast zur oft detektierten gesteigerten Sialylierung in Tumorgewebe [Christiansen et al., 2014] - die allerdings auch tumorzellspezifisch variiert und nicht direkt auf die Sialylierung einzelner Proteine schlussfolgern lässt. Vergleiche zwischen weiteren Tumorzelllinien und Primärgewebe in zukünftigen Studien könnten wichtige Hinweise dafür liefern, inwieweit die Glykosylierung von Orai1 und damit die Beeinflussung der Ca²⁺-Signalgebung in einzelnen Zelltypen auch an pathophysiologischen Vorgängen wie Krebs beteiligt sein könnte.

Sialyltransferasen wie ST6Gal1 werden zelltypspezifisch unterschiedlich exprimiert.

Von allen getesteten Sialyltransferasen konnte nur für ST6Gal1 und ST3Gal4 eine relevante Expression in T-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 18A), wobei die Expression von ST6Gal1 in naiven CD4-Zellen deutlich stärker war. Da ST3Gal4 und ST6Gal1 in Substratkonkurrenz stehen, deutet das Expressionsmuster auf eine verstärkte α -2,6-Sialylierung in primären CD4-Zellen hin.

Für die maßgeblich an der Sialylierung von Orai1 beteiligte Sialyltransferase ST6Gal1 wurde auf mRNA-Ebene eine zelltypspezifisch sehr variable Expression nachgewiesen. Die Expression korrelierte dabei mit dem relativen Anteil von sialyliertem Orai1 in den

jeweiligen Zelltypen.

Interessanterweise exprimierten HEK-Zellen, in denen die Überexpression von Orai1-N223A nicht zu einer Verstärkung von SOCE führte [Kilch, 2012] im Vergleich zu anderen Zelllinien fast keine ST6Gal1. Dies stellt die zelltypspezifische Expression von Sialyltransferasen als eine der möglichen Ursachen für die zelltypspezifischen Effekte der Deglykosylierung heraus. Ein direkter Zusammenhang zwischen der zelltypspezifischen Expression einzelner Sialyltransferasen und der zelltypspezifischen Modulation von SOCE durch Deglykosylierung konnte allerdings nicht identifiziert werden.

Da das mRNA-Level nicht unbedingt mit dem Protein-Level übereinstimmen muss [Dall'Olio et al., 2014], ist der direkte Nachweis der Sialylierung von Orai1 als Anhaltspunkt für den relativen Einfluss der Sialylierung im entsprechenden Zelltyp möglicherweise besser geeignet als Expressionsanalysen.

5.4.3 Der funktionelle Einfluss von ST6Gal1

Die Herunterregulation von ST6Gal1 führt zu einer Steigerung des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms.

Da endständige Sialylsäuren für die Vermittlung von Interaktionen zwischen Glykanbindenden Proteinen und Glykoproteinen von wesentlicher Bedeutung sind, sollte auch die funktionelle Beteiligung endständiger Sialylsäuren am SOCE-verstärkenden Effekt der Deglykosylierung ermittelt werden. Als Schlüsselenzym der Glykosylierung von Orai1 konnte im Rahmen dieser Arbeit die Sialyltransferase ST6Gal1 identifiziert werden.

Nach Herunterregulation von ST6Gal1 und damit der Anzahl α -2-6-verknüpfter, endständiger Sialylsäuren in der Glykan-Struktur von Orai1, konnte neben zelltypspezifisch variierenden Effektamplituden auch eine tendenzielle Steigerung von SOCE detektiert werden, die bei CD4-Zellen auch mit der Expression von ST6Gal1 korrelierte (s. Abb. 19). Hier schien die stärkere Expression von ST6Gal1 (naive CD4-Zellen > stimulierte CD4-Zellen) auch eine stärkere Amplifizierung von SOCE durch Herunterregulation von ST6Gal1 zu bewirken.

Da der Effekt der Herunterregulation von ST6Gal1 auf SOCE indirekt vermittelt werden sollte (ST6Gal1 \rightarrow Orai1 \rightarrow SOCE) und daher sowohl das *turnover* von ST6Gal1, wie auch das von Orai1 berücksichtigt werden müssen, war zu erwarten, dass der verstärkende Effekt auf SOCE erst 48 h nach Transfektion detektiert werden konnte.

Signifikant erhöht war der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom nach Herunterregulation von ST6Gal1 vor allem in Jurkat-T-Zellen, wobei die zusätzliche Transfektion mit siRNA gegen ST3Gal1, ST3Gal4 und ST3Gal6 keinen zusätzlich verstärkenden Effekt zu haben schien (s. Abb. 20). Da Jurkat-T-Zellen eine deutlich niedrigere Expression der ST6Gal1 zeigten als CD4-Zellen, scheint die erhöhte Zellproliferation und das dadurch verstärkte Protein-*Turnovers* einen ebenso starken Einfluss auf die Verstärkung von SOCE durch siRNA-vermittelte Herunterregulation von ST6Gal1 zu haben, wie die endogene ST6Gal1-Expression.

Die deutlich geringere Verstärkung von SOCE durch Herunterregulation von ST6Gal1 im Vergleich zur Expression von Orai1_{N223A} oder Behandlung mit Tunicamycin mag unter anderem der unvollständigen Herunterregulation von ST6Gal1 geschuldet sein, die möglicherweise einzelne Orai1-Untereinheiten des hexameren Kanalkomplexes mit der ursprünglichen Glykosylierung belässt. Dabei ist es denkbar, dass zur Vermittlung zwischen Orai1 und potentiellen Glykan-bindenden Proteinen lediglich eine glykosylierte Untereinheit ausreichend ist. Eine unvollständige Deglykosylierung würde dann den Effekt der Deglykosylierung überproportional hoch verdecken.

Möglicherweise wird der Effekt der Deglykosylierung aber auch nur teilweise über ST6Gal1-verknüpfte Sialylsäuren vermittelt und erst die vollständige Herunterregulation aller in Frage kommenden Sialyltransferasen wäre in der Lage das volle Potential des STGal vermittelten Einflusses auf die Funktion von Orai1 aufzudecken. Dennoch bleibt anzunehmen, dass der verstärkende Effekt der Deglykosylierung zumindest teilweise über endständige Sialylsäuren vermittelt wird, für deren Verknüpfung ST6Gal1 zuständig ist.

Eine Zunahme der Sialylierung und Expression von ST6Gal1 ist ein Merkmal vieler Tumorzellen [Christiansen et al., 2014], während für die reduzierten Expression von Orai1 bereits eine antiapoptotische Wirkung in Prostata-Zellen nachgewiesen werden konnte [Flourakis et al., 2010].

Eine sialylierungsbedingte Reduktion des Orai1 vermittelten Ca^{2+} -Einstroms und dadurch die Unterdrückung von Ca^{2+} induzierter Apoptose [Monteith et al., 2007] wäre so ein weiterer ergänzender Mechanismus zu anderen sialylierungsvermittelten antiapoptotischen Mechanismen, wie z.Bsp. der Sialylierung des FAS-Rezeptors [Swindall and Bellis, 2011], die sich positiv auf die Tumorentwicklung auswirken würde und deshalb als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt dienen könnte.

5.4.4 Inhibition der Golgi-Mannosidase II und der Effekt auf SOCE

Die Hemmung der Golgi-Mannosidase II durch Swainsonin führt tendenziell zu einem höheren speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom.

Tendenziell gesteigerte Ca^{2+} -Einstromraten konnten auch nach Behandlung mit Swainsonin beobachtet werden, die allerdings nur bei Thapsigargin induzierter Speicherentleerung signifikant waren (s. Abb. 21D-E). Die Simulation einer immunologischen Synapse in Jurkat-T-Zellen führt auch nach deutlich längerer Inkubation mit Swainsonin nicht zu signifikanten Effekten auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom (s. Abb. 21F-G). Der biochemische Nachweis der Deglykosylierung mit Swainsonin nach Aufreinigung über SNA-Beads und Detektion mit α -Orai1 deutete auf eine partielle Deglykosylierung hin (s. Abb. 21A-B). Möglicherweise war ist die ineffiziente Inhibierung der komplexen Glykosylierung die Ursache für den geringen funktionellen Einfluss.

5.5 Funktionelle Charakterisierung der Orai1-Glykosylierungsmutante

5.5.1 Stabile Überexpression von HA-Orai1_{WT/N223A} in Jurkat-T-Zellen und der Einfluss auf SOCE

Der verminderte Ca²⁺-Einstrom bei Überexpression von HA-Orai1_{WT} lässt sich durch gleichzeitige Überexpression von STIM1 teilweise rekonstituieren.

Für eine gleichbleibende und vergleichbare Expression von Orai1_{WT} und Orai1_{N223A} sowie biochemische Analysen wurden stabil HA-Orai1 exprimierende Jurkat-T-Zellen hergestellt, die entweder HA-Orai1_{WT} oder die Glykosylierungsmutante HA-Orai1_{N223A} nach genomischer Integration stabil exprimierten. Bei Analyse des speichergesteuerten Ca²⁺-Einstroms in den stabil HA-Orai1_{WT} exprimierenden Jurkat-T-Zellen konnte im Vergleich zu wildtypischen Jurkat-T-Zellen zunächst eine deutliche Reduktion des speichergesteuerten Ca²⁺-Einstroms detektiert werden, die sich durch heterologe Expression von STIM1 minimieren ließ (s. Abb. 22A) und deshalb durch das niedrige STIM1/Orai1-Verhältnis verursacht zu werden schien [Li et al., 2011] [Hoover and Lewis, 2011].

Stabil HA-Orai1_{N223A} überexprimierende Jurkat-T-Zellen haben einen höheren Ca²⁺-Einstrom als Orai1_{WT} überexprimierende Jurkat-T-Zellen.

Obwohl die Überexpression von Orai1_{WT} und Orai1_{N223A} in HEK293-Zellen bei Analyse von SOCE nicht zu signifikanten Unterschieden führte [Kilch et al., 2013], konnte im Rahmen dieser Arbeit für die gleiche Mutation bei stabiler Überexpression in Jurkat-T-Zellen ein Phänotyp mit signifikant gesteigertem Ca²⁺-Einstrom nachgewiesen werden (s. Abb. 22B-C), der auch schon von Gwack et. al in SCID-Fibroblasten gezeigt wurde [Gwack et al., 2007].

Da die Stärke des speichergesteuerten Ca²⁺-Einstroms auch von der absoluten Orai1-Proteinkonzentration sowie dem STIM1/Orai1-Verhältnis abhängig ist, wurde die relative Proteinkonzentration von Orai1_{WT} und Orai1_{N223A} in den stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen ermittelt. Dabei konnte für die relative Proteinkonzentration von HA-Orai1_{WT} und HA-Orai1_{N223A} im Durchschnitt kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (s. Abb. 23D-E), so dass eine veränderte Proteinkonzentration als alleinige Ursache des Effektes auszuschließen ist.

Darüber hinaus konnte die potentielle Amplifizierung von SOCE bei stabiler Expression von HA-Orai1_{N223A} statt HA-Orai1_{WT} auch durch Transfektion mit siRNA gegen die 3'UTR von endogenem Orai1 nicht wie erwartet verstärkt, sondern eher erniedrigt werden (s. Abb. 23C). Eine Überlagerung des verstärkenden Effektes durch endogenes Orai1_{WT}-Protein in den HA-Orai1_{N223A} überexprimierenden Jurkat-T-Zellen kann damit als unwahrscheinlich eingestuft werden. Möglicherweise hatte in dieser Zelllinie auch die Transfektion an sich einen modulierenden Einfluss auf den speichergesteuerten Ca²⁺-Einstrom.

Geht man davon aus, dass der Einfluss der Orai1-Glykosylierung auf SOCE durch die

Interaktion mit Glykan-bindenden Proteinen verursacht sein könnte, so muss auch die Möglichkeit einer Trans-Interaktion berücksichtigt werden [Crocker et al., 2007]. Dadurch könnte die Dichte der Zellen und damit die Anzahl von Kontakten zu Nachbarzellen während der Messung Auswirkungen auf vermittelte Effekte haben. Die Möglichkeit einer Trans-Interaktion wird zudem durch die Tatsache gestützt, dass bei einer homogenen, globalen Deglykosylierung (Tunicamycin, Expression in CHO_{Lec}-Zellen) der Vergleich zwischen Zellen mit Synthese von glykosyliertem Orai1 und Zellen mit Synthese von unglykosyliertem Orai1 zu konsistenteren Unterschieden im SOCE führte. Die Hypothese einer Trans-Interaktion könnte in weiteren Versuchen durch die ausschließliche Auswertung von Zellen ohne Kontakte zu Nachbarzellen getestet werden.

5.5.2 Einfluss von Tunicamycin auf SOCE in stabil Orai1_{WT/N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen

Die verstärkende Wirkung von Tunicamycin ist in stabil Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen signifikant schwächer ausgeprägt als in stabil Orai1_{WT} exprimierenden Jurkat-T-Zellen.

Da die verstärkende Wirkung von Tunicamycin auf den speichergesteuerten Ca²⁺-Einstrom in HA-Orai1_{WT} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen einen signifikant stärkeren Effekt zeigte als in HA-Orai1_{N223A} stabil exprimierenden T-Zellen (s. Abb. 24A-C), lässt sich schlussfolgern, dass die verstärkende Wirkung von Tunicamycin maßgeblich über Orai1 vermittelt wird. Von der N223A-bedingten, verringerten Verstärkung von SOCE nach Tunicamycin-Behandlung sind alle Phasen des speichergesteuerten Ca²⁺-Einstroms (Einstrom, Peak, Plateau) betroffen, woraus abgeleitet werden kann, dass die Tunicamycin bedingte Deglykosylierung von Orai1 für die Verstärkung aller drei Phasen verantwortlich ist.

Dass auch in HA-Orai1_{N223A} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen der verstärkende Effekt von Tunicamycin nicht komplett aufgehoben werden kann, mag zum Einem am Anteil von endogenen Orai1 in den HA-Orai1_{N223A} stabil exprimierenden T-Zellen liegen. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass auch die Deglykosylierung anderer Proteine mit modulatorischem Einfluss auf SOCE an der verstärkenden Wirkung von Tunicamycin beteiligt sein könnte. Zur endgültigen Klärung dieser Frage wäre jedoch eine vollständige Herunterregulation von endogenem Orai1 notwendig, die auch mit der zur Verfügung stehenden siRNA gegen die 3'UTR von Orai1 nicht realisiert werden konnte.

Im Gegensatz zur Ca²⁺-Einstromrate und dem Ca²⁺-Peak wurde das Ca²⁺-Plateau auch in HA-Orai1_{N223A} stabil exprimierenden T-Zellen durch die Tunicamycin-Behandlung noch deutlich erhöht. An der Tunicamycin-abhängigen Erhöhung sehr langfristiger Ca²⁺-Signale scheint also neben der Glykosylierung von Orai1 verstärkt die Glykosylierung weiterer Proteine, wie zum Bsp. STIM2 beteiligt zu sein, welches bei der Vermittlung langfristiger Ca²⁺-Antworten in T-Zellen ebenfalls eine Rolle spielt [Oh-Hora et al., 2008]. Über einen funktionellen Einfluss der STIM2 Glykosylierung ist bisher noch nichts bekannt.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich die Deglykosylierung von Orai1 als Hauptursache für den gesteigerten Ca^{2+} -Einstrom nach Tunicamycin-Behandlung in Jurkat-T-Zellen ableiten. Dabei scheint dem Glykan-Rest von Orai1 eine regulatorische Rolle zuzukommen, dessen Einfluss jedoch von der zelltypspezifischen komplexen Glykosylierung abhängt. Diese Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu den Ergebnissen von Czyż et. al., die die Glykosylierung von STIM1 für die verstärkende Wirkung der Tunicamycin-Behandlung verantwortlich machten [Czyż et al., 2009]. STIM1 ist jedoch nur basal glykosyliert und verfügt dementsprechend nicht über eine komplexe Glykosylierung.

5.5.3 SOCE nach physiologischer Stimulierung von stabil HA-Orai1_{WT} oder HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen

Bei Simulation einer immunologischen Synapse zeigen stabil HA-Orai1_{N223A} exprimierende Jurkat-T-Zellen im Vergleich zu stabil HA-Orai1_{WT} exprimierenden Jurkat-T-Zellen einen gesteigerten Ca^{2+} -Einstrom.

Auch bei der Simulation einer immunologischen Synapse mit $\alpha\text{-CD3}/\alpha\text{-CD28}$ -Beads konnte in HA-Orai1_{N223A} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen ein höherer Ca^{2+} -Einstrom als in HA-Orai1_{WT} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen gemessen werden (s. Abb. 24D-E). Die Deglykosylierung von Orai1 hat also nicht nur eine verstärkende Wirkung auf den durch Thapsigargin artifiziell induzierten, speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom, sondern auch auf den TCR-induzierten, speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom. Die Glykosylierung von Orai1 könnte also auch in physiologischen Zusammenhängen regulatorisch wirken und dadurch eine Rolle bei der Modulation langfristiger Ca^{2+} -Signale während des Aufbaus der immunologischen Synapse und der Ca^{2+} -abhängigen Gen-Expression übernehmen.

5.6 Expression von Orai1_{WT/N223A} in CHO_{WT/Lec}-Zellen

In CHO-Zellen defizient für komplexe Glykosylierung (CHO_{Lec}) zeigt die „genetische“ Deglykosylierung von Orai1 (Orai1_{N223A}) kaum noch einen Effekt auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom.

Die Expression von Orai1 in CHO_{Lec}-Zellen ermöglicht die Expression von ausschließlich *core*-glykosyliertem Orai1 (s. Abb. 25A). Bei niedrigem endogenem SOCE konnte in CHO_{WT}-Zellen bei heterologer Expression von Orai1_{N223A} im Vergleich zu Orai1_{WT} analog zur Überexpression in Jurkat-T-Zellen ebenfalls ein signifikant verstärkter Ca^{2+} -Einstrom gemessen werden (s. Abb. 25D-E). Weil in CHO_{Lec}-Zellen wegen ihrer Defizienz für mehrere Zucker-Transporter und Transferasen keine komplexe Glykosylierung mehr möglich ist, wird bei Transfektion mit Orai1_{WT} und Orai1_{N223A} Orai1_{WT} nur noch in der *core*-glykosylierten Form exprimiert.

Dass dies zu einer Angleichung von Einstromrate und maximaler Amplitude von SOCE führte (s. Abb. 25F-G), kann als weiterer Beweis dafür dienen, dass die verstärkende Wirkung der N223A-Mutante tatsächlich über die fehlende Glykosylierung und nicht über

die Mutation selbst vermittelt wird. Neben dem verminderten Unterschied bei Expression von Orai1_{WT} oder Orai1_{N223A} zeigten CHO_{Lec}-Zellen nach Transfektion mit Orai1 und STIM1 insgesamt einen deutlich erhöhten SOCE.

Der verstärkende Effekt der N223A-Mutation, der nur in CHO_{WT}-Zellen, nicht aber in CHO_{Lec}-Zellen messbar war, ließ sich in Patch-Clamp Messungen direkt für den Ca²⁺-Einstrom durch Orai1 (I_{Orai1}) reproduzieren (s. Abb. 26A-B). Der relative Unterschied zwischen CHO_{WT}- und CHO_{Lec}-Zellen war dabei für den Orai1-vermittelten Ca²⁺-Einstrom (I_{Orai1}) wesentlich kleiner als jener, der für SOCE in Imaging-Messungen ermittelt wurde. An der enormen Verstärkung von SOCE in den CHO_{Lec}-Zellen scheint also zusätzlich zu Orai1 auch die Glykosylierung anderer Speicher-assoziiierter Proteine beteiligt zu sein; ein möglicher Kandidat hierzu wäre zum Beispiel TRPC1 [Cheng et al., 2011].

Neben dem speichergesteuerten Ca²⁺-Einstrom war auch die Thapsigargin-induzierte Speicherentleerung in CHO_{Lec}-Zellen gegenüber CHO_{WT}-Zellen deutlich erhöht, was möglicherweise auf die veränderte Glykosylierung von Proteinen zurückzuführen ist, welche wie SERCA oder der IP3-Rezeptor an der Aufrechterhaltung der Ca²⁺-Homöostase mitwirken [Roberts-Thomson et al., 2010].

Da die vergrößerte Speicherentleerung in CHO_{Lec}-Zellen erst nach Kotransfektion mit Orai1 und STIM1 messbar war, mag an dem Phänomen zusätzlich ein Feedback-Mechanismus beteiligt sein, bei dem erst der erhöhte Ca²⁺-Einstrom durch die Überexpression von STIM1 und Orai1 den erhöhten Ca²⁺-Gehalt im ER zur Folge hat. In einen solchen Mechanismus ist über die Interaktion mit dem Ca²⁺-abhängig regulierten Calnexin auch die potentiell glykosylierbare ER-Plasmamembranpumpe SERCA involviert [Vangheluwe et al., 2005].

5.6.1 Einfluss von Tunicamycin auf den speichergesteuerten Ca²⁺-Einstrom in CHO_{WT}-Zellen

Auch in CHO-Zellen zeigt Tunicamycin tendenziell eine verstärkende Wirkung auf SOCE.

Im Gegensatz zur Expression von Orai1_{N223A} war der Effekt der Tunicamycin-Behandlung auf den speichergesteuerten Ca²⁺-Einstrom in Orai1_{WT}-transfizierten CHO_{WT}-Zellen nicht signifikant (s. Abb. 26C-D). Vergleicht man den SOCE-verstärkenden Effekt der Transfektion mit Orai1_{N223A} an Stelle von Orai1_{WT} (s. Abb. 25D-D) mit dem Effekt der Tunicamycin-Behandlung in Orai1_{WT}-transfizierten CHO_{WT}-Zellen, so zeigt die Tunicamycin-Behandlung einen wesentlich geringen Effekt als die Expression von Orai1_{N223A} statt Orai1_{WT}, obwohl der entsprechende Westernblot eine deutliche Deglykosylierung zeigte (s. Abb. 25A).

Durch die Behandlung mit Tunicamycin werden alle Proteine der Zelle deglykosyliert. Es ist durchaus denkbar, dass dadurch auch andere, eventuell zelltypspezifische Modulatoren von SOCE deglykosyliert und so in ihrer Funktion verändert werden. Für einen funktionell veränderten Modulator ist theoretisch auch ein reduzierender Einfluss auf SOCE

denkbar. Dieser SOCE reduzierende Einfluss könnte den SOCE verstärkenden Einfluss der Deglykosylierung von Orai1 überlagern und so insgesamt zu einer geringeren Verstärkung von SOCE führen.

5.7 Der Einfluss von PHA auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom

Die PHA-induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird nicht direkt über SOCE und I_{CRAC} vermittelt.

Während nach Applikation von PHA eine allgemeine Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gezeigt werden konnte (s. Abb. 27A), führte die Applikation weder in Imaging-Messungen von SOCE noch in Patch-Clamp-Messungen von I_{CRAC} zu einem Effekt auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom (s. Abb. 27B-C). Es scheint damit unwahrscheinlich, dass der mitogene Effekt von PHA über einen direkten modulatorischen Einfluss auf die Funktion von Orai1 verursacht wird.

5.8 Mögliche Ursachen für die Verstärkung von SOCE und I_{CRAC} durch Deglykosylierung

5.8.1 Der Einfluss einer CD95-Stimulation auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom

Die verminderte Sialylierung von CD95 ist nicht der Grund für die deglykosylierungsinduzierte Verstärkung von SOCE.

Frühere Veröffentlichungen konnten auch den Einfluss einer ST6Gal1-vermittelten Sialylierung auf den Fas-Rezeptor (CD95) zeigen [Swindall and Bellis, 2011]. Dessen Aktivierung sollte innerhalb von Minuten zu einer Kolo-kalisation von STIM1 und Orai1 sowie örtlich begrenztem Ca^{2+} -Einstrom führen [Khadra et al., 2011] und würde somit eine indirekte Möglichkeit darstellen, Glykosylierungs-abhängig Änderungen am speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom zu induzieren.

Nach Vorversuchen, in denen die Fas-aktivierende und Apoptose-induzierende Wirkung von α -CD95 (Apo1.1) gezeigt werden konnte (s. Abb. 27D-E), wurde der Einfluss von α -CD95 auf den Ca^{2+} -Einstrom untersucht. Hierbei konnte in Jurkat-T-Zellen durch Stimulation von Fas keine kurzfristige Änderung des zytosolischen Ca^{2+} induziert werden (s. Abb. 27F), so dass ein Einfluss der Glykosylierung/Deglykosylierung von Fas auf den speichergesteuerten Kalzium-Einstrom unter den verwendeten Bedingungen ausgeschlossen werden kann.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Glykosylierungs-Muster von Orai1 nicht nur zelltypspezifisch ist, sondern auch die Funktion von Orai1 beeinflussen

kann.

Wie wichtig die strikte Kontrolle der Glykosylierung (z.B. des T-Zell-Rezeptors) und der Aktivierung von Orai1 für eine angemessene Reaktion des Immunsystems sind, konnte bereits in vielen Veröffentlichungen gezeigt werden. Dabei wurden neben der Glykosylierung verschiedener Plasmamembranproteine [Dalziel et al., 2014], sowohl überschießende wie auch unzureichende STIM1/Orai1-Signale als Ursache für fehlerhafte T-Zell-Antworten identifiziert [Izquierdo et al., 2013] [Kim et al., 2014] [Lin et al., 2013] [McCarl et al., 2010] [Schuhmann et al., 2010] [Shaw and Feske, 2012].

Ein Zusammenhang zwischen Glykosylierung und der Funktion von Orai1 konnte jedoch erst im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. Dabei sind Glykosylierungs-bedingte Änderungen der Funktion von Orai1 als mögliche Ursache für unausgewogene Ca^{2+} -Signalgebung nicht nur in Autoimmunerkrankungen denkbar. Auch im pathophysiologischen Zustand der Krebserkrankung konnten bereits eine Beteiligung von Glykosylierung [Varki and Gagneux, 2012] wie auch veränderte Ca^{2+} -Signale dokumentiert werden [Dubois et al., 2013] [Motiani et al., 2013].

Wie diese Arbeit zeigt, variiert das Glykosylierungs-Muster von Orai1 in den verschiedenen Krebszelllinien (abgeleitet von Mastzellen, Melanomazellen, B-Zellen und T-Zellen) sowie zwischen Jurkat-T-Zellen und primären menschlichen CD4-Zellen, was auf eine Glykan-abhängige Änderung der Orai1-Funktion als eine der Ursachen für veränderte SOCE-Signalen in Krebs hindeuten könnte.

Die Glykosylierung von Orai1 hätte durch ihre Zelltypspezifität und funktionellen Einfluss auf die Ca^{2+} -Signalgebung also nicht nur ein breites Spektrum von möglichen Einflüssen auf die Funktion gesunder Immunzellen, sondern auch auf die Funktion entarteter Zellen bei Krebserkrankungen.

Eine Rolle als Tumor-assoziiertes Glykoprotein und seine Rolle bei der zellulären Ca^{2+} -Signalgebung, würden Orai1 zu einem interessanten Zielprotein für die Voraussage von Tumorerkrankungen, Überwachung des Therapieerfolges und potentielle Therapeutika machen.

5.8.2 Die anteilige Lokalisation von Orai1 an der Plasmamembran

Der prozentuale Anteil von Orai1 an der Plasmamembran ist bei Orai1_{WT} tendenziell höher als bei Orai1_{N223A}.

Bei Bestimmung der plasmamembranständigen Anteile von Orai1_{WT} und Orai1_{N223A} in den stabil HA-Orai1_{WT/N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen konnte für Orai1_{N223A} ein tendenziell niedrigerer Plasmamembrananteil nachgewiesen werden (s. Abb. 28A-B). Dies ist ein durchaus erwartetes Ergebnis, da z. B. auch die komplexe Glykosylierung des ebenfalls Ca^{2+} -selektiven TRPV5-Kanals dessen Oberflächenexpression stabilisiert [Leunissen et al., 2013].

Im Gegensatz zu den meisten anderen Ionenkanalproteinen, kann bei Orai1 aber auch eine verminderte Lokalisation an der Plasmamembran zu einem erhöhten Strom führen,

wenn dadurch das STIM1/Orai1-Verhältnis optimiert wird [Hoover and Lewis, 2011]. Da bei Überexpression von Orai1 im Vergleich zu untransfizierten Jurkat-T-Zellen bereits ein signifikant reduzierter Ca^{2+} -Einstrom gezeigt werden konnte (s. Abb. 22A), könnte eine verminderte Lokalisation von Orai1_{N223A} an der Plasmamembran zu einer Verstärkung von SOCE führen. Die verminderte Expression an der Plasmamembran käme demnach als mögliche Ursache für die SOCE-verstärkende Wirkung der Orai1-Glykosylierungs-Mutante Orai1_{N223A} in Betracht.

Eine Möglichkeit diese Hypothese zu testen, bestände in der Verwendung mehrerer Orai1_{WT/N223A} stabiler Jurkat-T-Zelllinien mit unterschiedlich starker Expression von Orai1. Für den Fall, dass der stromverstärkende Effekt von Orai1_{N223A} tatsächlich aus einem optimierten STIM1/Orai1-Verhältnis resultiert, sollten unterschiedliche Expressionslevel von Orai1 einen Effekt auf die Orai1_{N223A} vermittelte Verstärkung von SOCE zeigen.

5.8.3 Die Multimerisierung von Orai1

Orai1 bildet Hexamere.

Über chemische Quervernetzung (*Crosslinking*), Auftrennung und Nachweis im Westernblot ließen sich für Orai1-Multimere bestehend aus 1-6 Monomeren nachweisen (s. Abb. 28C-D). Dabei stellte die schwache Auflösung im höhermolekularen Bereich einen limitierenden Faktor für die Größe der nachweisbaren Banden dar. Es lässt sich nicht ausschließen, dass durch die Quervernetzung auch Produkte entstanden sind, die sich aus mehr als 6 Orai1-Monomeren zusammensetzten - mit der verwendeten Methode jedoch nicht nachweisbar waren.

Auch die Möglichkeit, dass die Multimere durch Quervernetzung zweier benachbarter Kanäle entstanden sind und sich nicht ausschließlich aus Einheiten eines einzelnen Kanals zusammensetzten, sollte dabei berücksichtigt werden. Selbst STIM1 jedoch, dessen Interaktion mit Orai1 unzählige Male dokumentiert wurde, konnte nach induzierter Speicherentleerung und chemischer Quervernetzung unter den hier gewählten Bedingungen nicht mit HA-Orai1 kopräzipitiert werden (nicht gezeigt). Es ist also anzunehmen, dass es sich bei den nachgewiesenen Komplexen um besonders eng interagierende Proteine und damit vermutlich Multimere von Orai1 handelt, die zusammen einzelnen Kanal-Einheiten bilden.

Beim Vergleich der errechneten Monomer-Molekulargewichte von Orai1 aus stabil HA-Orai1_{N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen und mit Tunicamycin behandelten stabil HA-Orai1_{WT} exprimierenden Jurkat-T-Zellen zeigte sich außerdem ein geringeres Molekulargewicht für Orai1 in den Tunicamycin behandelten, stabil Orai1_{WT} exprimierenden Jurkat-T-Zellen. Dies weist auf Heteromere aus endogenem Orai1_{WT} und Orai1_{N223A} in Lysaten aus HA-Orai1_{N223A} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen hin. Hier könnte eine Analyse nach Transfektion mit siRNA gegen die 3'UTR von Orai1 zusätzliche Gewissheit schaffen.

Ausgehend vom theoretischen HA-Orai1-Molekulargewicht (~ 36 kDa) für glykosylier-

rungsfreies Orai1 und dem Orai1-Monomer-Molekulargewicht in HA-Orai1_{WT} überexprimierenden Zellen (~ 65 kDa) für maximal glykosyliertes Orai1, sollte die Glykosylierung ~ 28 kDa ausmachen. Da auch bei HA-Orai1_{WT} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen theoretisch auch noch unglykosylierte Orai1-Monomere Teil der Multimere sein könnten, wäre es möglich, dass das Gewicht der Glykosylierung sogar höher liegt. Geht man von 28 kDa für das Gewicht der Orai1-Glykosylierung aus, so würde die Differenz der Hexamer-Gewichte ergeben, dass auch in HA-Orai1_{N223A} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen ~ 3/6 der Orai1-Einheiten noch ihre Glykosylierung tragen.

Neben der Lokalisation, scheint auch die Multimerisierung von Orai1 von der Glykosylierung beeinflusst zu werden. Dabei konnte eine verstärkte Multimerisierung nach Aktivierung des Kanals aber lediglich bei zeitlich getrennter Speicherentleerung und Induzierung von SOCE (Induzierung von SOCE 15 min nach Speicherentleerung) in HA-Orai1_{N223A} stabil exprimierenden Jurkat-T-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 28E-F). Da der funktionsfähige Kanal aus Multimeren besteht, könnte eine verstärkte Multimerisierung auch zu einer erhöhten Anzahl funktionsfähiger Kanäle und damit einem erhöhten Ca²⁺-Einstrom führen.

Zusätzlich bleibt aber zu klären, ob das optimale STIM1/Orai1-Verhältnis von der Anzahl verfügbarer STIM1 Moleküle pro Kanal oder pro Orai1-Einheit abhängt. Für den Fall, dass das STIM1/Kanal Verhältnis den limitierenden Faktor für Amplitude von SOCE darstellt, wäre eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Grad der Multimerisierung und der Amplitude von SOCE unwahrscheinlich.

Neben den bereits untersuchten Mechanismen, die theoretisch zu einer Verstärkung von SOCE führen könnten, wäre auch eine Beeinflussung der sterischen Anordnung innerhalb des Kanals durch die Glykosylierung denkbar. Die Glykosylierungsstelle von Orai1 liegt im zweiten extrazellulären Loop von Orai1, für den bisher noch keine Kristallstruktur verfügbar ist [Hou et al., 2012], was auf eine hohe Flexibilität hindeuten könnte. Durch Beeinflussung der sterischen Anordnung in diesem Loop, könnte die Glykosylierung auch direkten Einfluss auf die Leitfähigkeit des Kanals nehmen.

5.9 Die Interaktion von Orai1 mit glykobindenden Proteinen

5.9.1 Die Interaktion von Orai1 mit Siglecs

Durch die selektive Aufreinigung mit verschiedenen Lektinen konnte die komplexe Glykosylierung von Orai1 inklusive endständiger Sialylierung gezeigt werden. Eine Familie von Glykan-bindenden-Proteinen, die an endständige Sialylsäuren bindet, ist die Familie der Siglecs, deren Mitglieder teilweise bevorzugt sulfatierte Zielsequenzen erkennen. Sie werden in vielen Immunzellen exprimiert, wo sie in die Regulierung der Immunantwort involviert und wegen ihrer Beteiligung an Autoimmun- und Krebserkrankungen, auch von hohem

therapeutischem Interesse sind [Crocker et al., 2007].

Um die Gruppe der möglichen Interaktionspartner weiter einzugrenzen, wurde die potentielle Bindung zu Siglecs zunächst mittels NaClO_3 -vermittelter Desulfatierung unterbunden.

Die Desulfatierung mit NaClO_3 verstärkt SOCE und I_{CRAC} in HMC1.2-Mastzellen.

Der divergierende Effekt der Desulfatierung in Jurkat-T-Zellen und HMC1.2-Mastzellen (s. Abb. 29B-E) deutet auf eine unterschiedliche Beteiligung von Sulfo-Glykan-bindenden Proteinen an der Modulation von SOCE in den beiden getesteten Zelllinien hin. HMC1.2-Mastzellen zeigten dabei nach Desulfatierung die gleiche Verstärkung von SOCE, die auch nach Tunicamycin-Behandlung nachgewiesen werden konnte. Mittels der Patch-Clamp-Technik konnte auch die Verstärkung von I_{CRAC} nach Desulfatierung nachgewiesen und so gezeigt werden, dass der Strom durch den CRAC-Kanal selbst verändert wird (s. Abb. 29F-G).

Die NaClO_3 -induzierte Zunahme der Speicherentleerung in beiden Zelltypen scheint an der verstärkenden Wirkung der Desulfatierung nicht beteiligt zu sein, da Jurkat-T-Zellen bei gleichsamer Steigerung der Speicherentleerung im Gegensatz zu Mastzellen keine Verstärkung sondern eine leichte Reduzierung von SOCE nach NaClO_3 -Behandlung zeigten.

Bei Expressionsanalysen konnte für die meisten getesteten Siglecs in HMC1.2-Mastzellen eine deutlich höhere Expression als in Jurkat-T-Zellen gezeigt werden (s. Abb. 29A). Dies würde auch die fehlende Verstärkung von SOCE in Jurkat-T-Zellen nach Desulfatierung erklären. Eine weitere Erklärung für den zelltypspezifischen Effekt wäre eine zelltypspezifische Maskierung der Siglecs durch andere, sialylierte Cis-Liganden [Crocker et al., 2007], die sich bei der niedrigen Siglec-Expression in Jurkat-T-Zellen besonders gravierend auswirken würde.

Da in frühen Studien bereits gezeigt werden konnte, dass die Behandlung mit Chlorat weder die Proteinsynthese inhibiert noch sonstige toxische Effekte zeigt [Baeuerle and Hutter, 1986], könnte sich lediglich die Desulfatierung anderer Regulatoren von SOCE ebenfalls auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom auswirken und eine alternative Erklärung für die SOCE verstärkende Wirkung der NaClO_3 -Behandlung liefern. Aus der Literatur sind bisher jedoch noch keine Regulatoren von SOCE bekannt, die durch Sulfatierung reguliert werden könnten.

Die Behandlung mit NaClO_3 hat keine signifikanten Auswirkungen auf das Protein- und mRNA-Level von Orai1 und STIM1 in HMC1.2-Mastzellen.

Bei Überprüfung der Protein- und mRNA-Level von Orai1 und STIM1 in Jurkat-T-Zellen und HMC1.2-Mastzellen mit und ohne NaClO_3 -Behandlung konnten in HMC1.2-Mastzellen weder signifikante Veränderungen auf mRNA- noch auf Protein-Ebene detektiert werden; auch wenn das mRNA-Level von Orai1 tendentiell erhöht war (s. Abb. 30A-C). Signifikant erhöhte mRNA- und Protein-Level von STIM1 waren lediglich bei Jurkat-T-Zellen

festzustellen, in denen die Behandlung jedoch keine verstärkende Wirkung auf SOCE zeigte (s. Abb. 30D-F). Ein direkter Zusammenhang zwischen NaClO_3 -induzierten Änderungen der Proteinkonzentrationen von STIM1 und Orai1 und der verstärkenden Wirkung von NaClO_3 auf SOCE scheint damit unwahrscheinlich.

Die Herunterregulation von Siglec-6 und Siglec-8 führt zu einer Erhöhung von SOCE in HMC1.2-Mastzellen.

Ein verstärkender Effekt auf SOCE, wie ihn Desialylierung und Desulfatierung zeigten, konnte auch nach Herunterregulation von Siglec-6 und Siglec-8 gemessen werden, für die α -2-3 (Siglec-8) [Macauley et al., 2014] und/oder α -2-6 verknüpfte Sialylsäuren (Siglec-6, Siglec-8) [Macauley et al., 2014] [Floyd et al., 2000] als potentielle Bindemotive in Frage kommen. Während die Herunterregulation von Siglec-6 mit der entsprechenden siRNA nur 24 h nach Transfektion zu einer leichten Verstärkung von SOCE führte, konnte der SOCE-verstärkende Effekt mit siRNA-vermittelter Herunterregulation von Siglec-8 durch konsekutive Transfektion auf ein signifikantes Level angehoben werden (s. Abb. 31B-E)

Dies lässt Siglec-8 eine Rolle als potentieller Interaktionspartner von Orai1 in Mastzellen zukommen, wo der Fehlregulation von SOCE bereits eine Beteiligung an Autoimmunreaktionen nachgewiesen werden konnte [Chang et al., 2008] [Di Capite et al., 2011]. Untermuert wird diese Hypothese auch durch frühere Veröffentlichungen, in denen die Aktivierung von Siglec-8 in Mastzellen zu einer verringerten Ca^{2+} -Antwort führte [Yokoi et al., 2008]. Diese wurden von Yokoi auf Grund weiterer Experimente in RBL-Zellen jedoch mit der Inhibierung von Fc ϵ RI (hoch affiner Rezeptor für die Fc-Region von Immunglobulin E) durch die ITIM-Domäne von Siglec-8 begründet.

Resultierend aus den gewonnenen Ergebnissen lässt sich für HMC1.2-Mastzellen ein Modell ableiten, bei dem die Interaktion von Siglec-8 mit Orai1 den Kanal in der Membran hält und dadurch die Endozytose verhindert. Das daraus resultierende, suboptimale STIM1/Orai1-Verhältnis ermöglicht nicht die volle Kanalaktivierung, so dass eine Unterbrechung der Siglec-8-Orai1-Interaktion durch Deglykosylierung, Desialylierung, Desulfatierung oder Herunterregulation von Siglec-8 eine Potenzierung von SOCE und I_{CRAC} zur Folge hat.

Im Zusammenhang mit der inhibitorischen Domäne von Siglec-8 ist jedoch auch ein unabhängiger Mechanismus denkbar, bei dem der verstärkende Effekt von Desulfatierung und Siglec-8-Herunterregulation lediglich aus der mangelnden Quervernetzung und Aktivierung bzw. Expression und dadurch verringerten negativen Signalgebung der Siglec-8-ITIM-Domäne resultieren könnte [Yokoi et al., 2008].

Auch ein Szenario, bei dem die Orai1-Siglec-8-Interaktion lediglich das *Clustering* von Siglec-8 mit anderen Signalgebern wie dem Fc ϵ RI verhindert und so die negative Siglec-8-vermittelte Signalgebung reduziert, sowie eine Kombination aus mehreren Modellen ist denkbar.

Um den direkten Zusammenhang zwischen Glykan-Sulfatierung, Siglec-8 und der

Glykosylierung von Orai1 zu zeigen, könnten auch die Effekte der NaClO_3 -Behandlung und der Herunterregulation von Siglec-8 auf SOCE zwischen Orai1_{WT} und Orai1_{N223A} exprimierenden HMC1.2-Mastzellen verglichen werden. Auf Grund der langen Inkubation mit NaClO_3 in den durchgeführten Versuchen und des endogenen Anteils von Orai1_{WT} in HMC1.2-Mastzellen wäre für solche Versuche die vorausgehende Etablierung einer stabil Orai1_{WT/N223A} exprimierenden HMC1.2-Mastzelllinie von großem Vorteil.

Die durch Herunterregulation von Siglec-8 vermittelte Verstärkung von SOCE ist sehr gering ($\sim 10\%$), wobei Siglec-8 vermutlich auch eher eine modulatorische Rolle bei der Regulation von SOCE zukommt. Wegen technischer Limitierungen, wie z. B. der unvollständigen Herunterregulation durch die verwendete siRNA (s. Abb. 31A), konnten die bislang erhobenen Daten das volle Potential von Siglec-8 bei der Regulation von SOCE möglicherweise noch nicht vollständig aufdecken.

Da die inhibitorische Signalgebung von Siglecs auch über Phosphorylierung von der Zellaktivierung abhängen kann [von Gunten and Bochner, 2008], wäre zusätzlich auch ein negativer Rückkopplungsmechanismus denkbar, bei dem der erhöhte Ca^{2+} -Einstrom nach verringerter Orai1-Siglec-8-Interaktion zu einer verstärkten negativ-signalgebenden Siglec-Aktivität führen und so den SOCE-verstärkenden Effekt teilweise überdecken würde.

Bei der Beurteilung von Siglec-Effekten sollten zudem mögliche Trans-Interaktionen berücksichtigt werden [Crocker et al., 2007]. Demnach könnte auch die Zelldichte während der Messung Auswirkungen auf vermittelte Effekte haben und sollte gegebenenfalls in die Auswertung miteinbezogen werden.

Darüber hinaus könnte auch die Analyse Ca^{2+} -induzierter Änderungen im Zellverhalten wie Proliferation und Cytokin-Sekretion in Abhängigkeit vom Siglec-Protein-Level einen Anhaltspunkt für die Bewertung Siglec-vermittelter Einflüsse auf die Funktion von Orai1 liefern.

Siglec-8 wurde bereits als therapeutisches Zielprotein zur Behandlung einer Reihe von Mastzell-assoziierten Autoimmunerkrankungen vorgeschlagen. Weitere Untersuchungen zur potentiellen Modulation des STIM1/Orai1-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms durch Siglec-8 könnten dabei zeigen, inwiefern eine zusätzliche, direkte Beeinflussung von SOCE die Siglec-8 basierte Immuntherapie unterstützen könnte.

5.9.2 Die Interaktion von Orai1 mit Galektinen

Die Inhibierung der Galektin-Bindung führt zu einer Reduktion von SOCE und I_{CRAC} .

Da Galektine ebenso wie veränderte Ca^{2+} -Signale in Zusammenhang mit Entzündungen und Tumorentwicklung stehen, wurde auch eine mögliche Modulation von Ca^{2+} -Signalen durch Galektine untersucht.

Die im Durchschnitt signifikant erniedrigten Raten des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms, die nach Inkubation mit Laktose in Imaging-Experimenten für SOCE gemessen werden konnten, deuteten sich tendentiell auch in den durchgeführten Patch-Clamp-

Experimenten für I_{CRAC} an (s. Abb. 32A-C). Sie weisen auf eine Verstärkung von SOCE durch Galektin-Bindung hin, wie sie auch von Walzel et al. vorgeschlagen wurde [Walzel et al., 2006].

Vergleichbar mit Laktose blockieren auch endständige Sialylsäuren potentielle Galektin-Bindestellen. Die Herunterregulation von ST6Gal1 und damit die Zunahme von Galektin-Bindestellen zeigte genau den verstärkenden Effekt auf SOCE, der das bereits erwähnte Modell der Galektin-Bindung mit SOCE-amplifizierendem Einfluss bestätigt.

Geht man von einer direkten Bindung der Galektine an Orai1 aus, so sollte eine komplette Deglykosylierung mit Tunicamycin oder die genetische Deglykosylierung von Orai1 (N223A) zu einer Aufhebung der Galektin-Bindung und dadurch zu einem reduzierten Ca²⁺-Einstrom führen - entgegengesetzt zu den bereits gezeigten Beobachtungen, die nach Tunicamycin-Behandlung und Expression von Orai1_{N223A} statt Orai1_{WT} stets einen erhöhten Ca²⁺-Einstrom zeigten.

Eine mögliche Erklärung zu den erzielten Ergebnissen würde eine Erweiterung des Modelles liefern, in dem Galektine nicht direkt an Orai1 binden. Die Bindung der Galektine müsste stattdessen an ein unbekanntes (selbst-)glykosyliertes Protein O_{Gly}BP (Orai1_{glykosyliert}-bindendes-Protein) mit Galektin-Bindestellen erfolgen, das dann direkt an glykosyliertes (sialyliertes) Orai1 binden würde. So könnte die Bindung der Galektine an O_{Gly}BP die Interaktion von Orai1 mit O_{Gly}BP limitieren.

Die Vernetzung von O_{Gly}BP innerhalb des Galektin-*Lattice* würde dabei die maximale Interaktion von O_{Gly}BP mit Orai1 und damit ein noch niedrigeres STIM1/Orai1-Verhältnis und eine weitere Reduzierung des Ca²⁺-Einstroms verhindern (s. Abb. 35A).

Würde die Galektin-Bindung (durch Laktose) unterbrochen, so sollte die maximale O_{Gly}BP-Interaktion mit Orai1 auf Grund des erniedrigten STIM1/Orai1-Verhältnisses zu einer Verringerung von SOCE führen (s. Abb. 35B).

Würde hingegen die Interaktion der O_{Gly}BPs mit Orai1 durch Deglykosylierung mittels Herunterregulation von ST6Gal1 (s. Abb. 35C), Tunicamycin, Mutation der Glykosylierungsstelle, Desulfatierung und damit Modifikation der O_{Gly}BP-Bindestelle oder Herunterregulation der O_{Gly}BPs unterbrochen (s. Abb. 36A-C), so sollte Orai1 stärker internalisiert werden und das steigende STIM1/Orai1-Verhältnis zu einer Verstärkung des Ca²⁺-Einstroms führen.

Auch wenn der Effekt von Laktose auf SOCE in HMC1.2-Mastzellen noch nicht getestet wurde, so käme für die Rolle von O_{Gly}BP in HMC1.2-Mastzellen z. B. das bereits als Glykoprotein nachgewiesene Siglec-8 [Freeman et al., 2001] in Frage. In Jurkat-T-Zellen, wo Siglecs kaum exprimiert werden, könnte die Rolle von O_{Gly}BP z. B. von L-Selectin übernommen werden. Auch wenn für L-Selectin hauptsächlich die Bindung an O-glykosylierte Proteine gezeigt wurde, so konnte auch die Bindung an N-glykosylierte Proteine bereits nachgewiesen werden [Mitoma et al., 2007].

Da es sich bei Galektinen um lösliche Proteine handelt, ist die Reproduktion physiologischer Vorgänge in Perfusionssystemen, wie dem verwendeten Imaging-Setup oder während

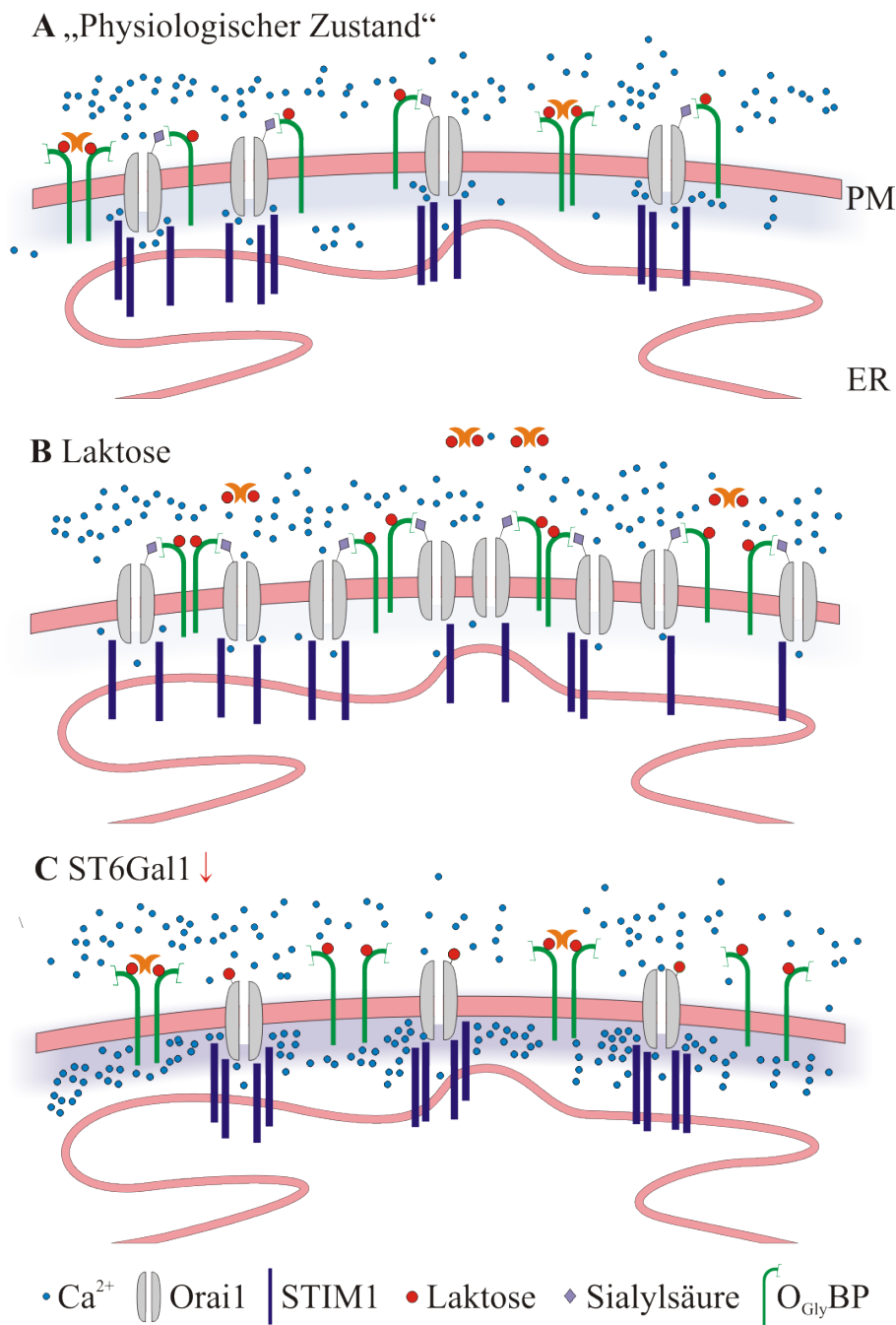


Abbildung 35: **Modell zur Modulation von SOCE durch Orai1-Glykosylierung und Glykan-bindende Proteine.** **A:** Im „physiologischen Zustand“ ist ein Teil der „glykosyliertes-Orai1-bindenden Proteine“ (O_{Gly}BP)s von Galektinen gebunden, der andere Teil interagiert mit Orai1 und erhöht dadurch die Retention an der Plasmamembran (PM), was in einem suboptimalen STIM1/Orai1-Verhältnis resultiert. **B:** Wird die Galektin-Bindung durch freie Laktose im Kulturmedium inhibiert, führt dies zu einer maximalen Interaktion von O_{Gly}BPs und Orai1-Proteinen, wodurch die Retention von Orai1 an der Plasmamembran weiter ansteigt. Durch das resultierende, erniedrige STIM1/Orai1-Verhältnis wird SOCE im Vergleich zum „physiologischen Zustand“ A reduziert. **C:** Durch Herunterregulation von ST6Gal1 kann Orai1 nicht länger mit O_{Gly}BPs interagieren. Die Retention des Proteins an der Plasmamembran wird erniedrigt und das höhere (optimalere) STIM1/Orai1-Verhältnis führt zu einer Verstärkung von SOCE.

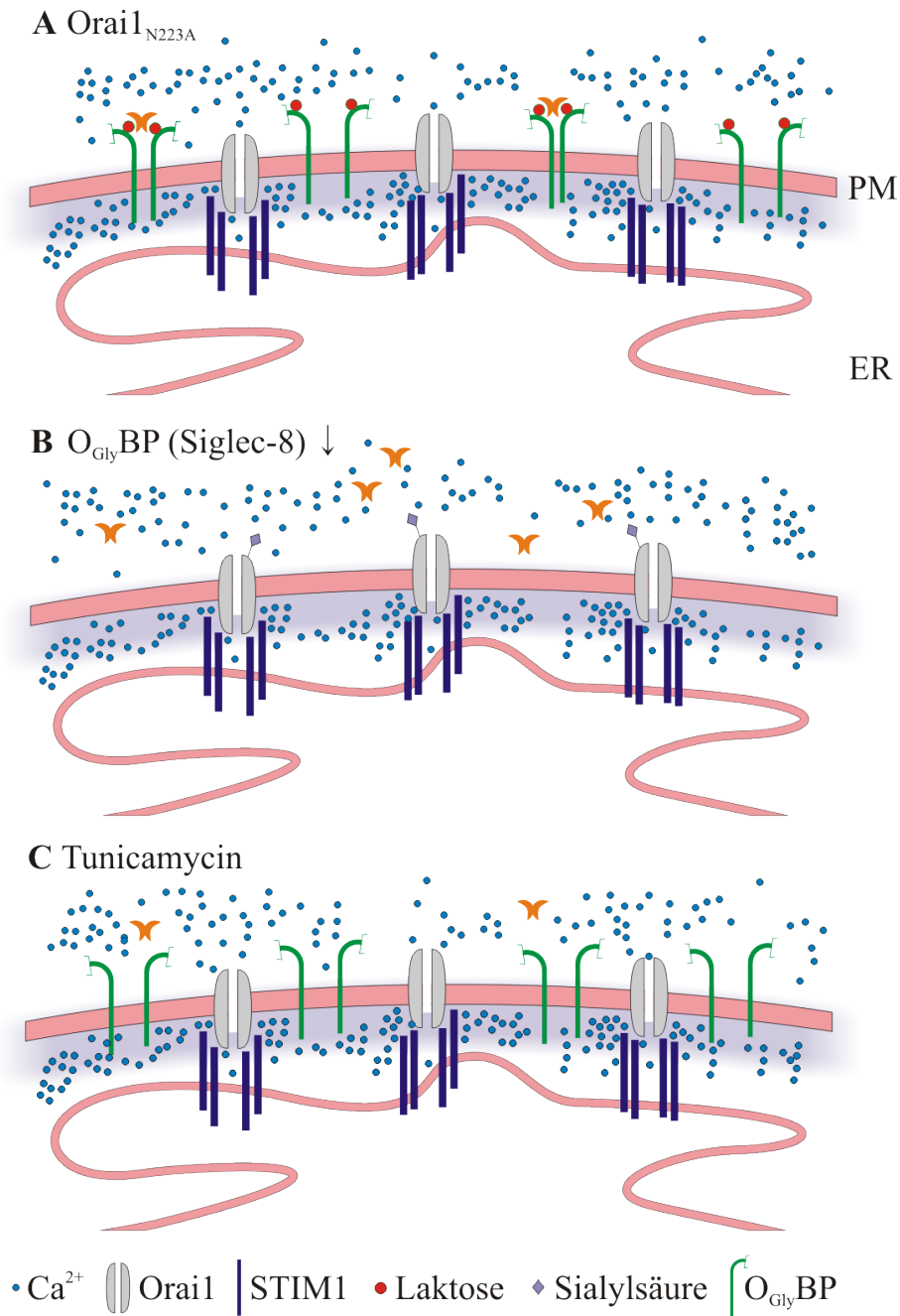


Abbildung 36: **Modell zur Modulation von SOCE durch Orai1-Glykosylierung und Glykan-bindende Proteine.** **A** Bei Mutation der Orai1 Glykosylierungsstelle N223 zu N223A kann Orai1 nicht länger mit „glykosyliertes-Orai1-bindenden Proteinen“ (O_{Gly}BPs) interagieren. Die Retention des Proteins an der Plasmamembran ist erniedrigt und das höhere STIM1/Orai1-Verhältnis führt zu einer Verstärkung von SOCE. **B:** Durch Herunterregulation der O_{Gly}BPs wird die Interaktion von Orai1 mit O_{Gly}BPs reduziert, woraus die gleichen Folgen wie in A resultieren. **C:** Die globale Deglykosylierung mit Tunicamycin (oder Expression in CHO_{Lec}) verhindert ebenfalls die Interaktion der O_{Gly}BPs mit Orai1 mit den gleichen Folgen wie in A und B.

Patch-Clamp-Messungen, mit isolierten Zellen schwer möglich; zumal das extrazelluläre Milieu auch durch Mediumswechsel während der Kultur und bei den Messvorbereitungen ständig verändert wird. Mit kontinuierlicher Kultur sowie Messungen ohne Wechsel des extrazellulären Mediums könnte die Inkonsistenz bei Effekten Galektin-vermittelter Interaktionen möglicherweise weiter reduziert werden.

Studien, in denen zur Inhibition der Galektin-Bindung Glykodendrimeren mit 2-8 Laktose-Einheiten statt freier Laktose eingesetzt wurden, konnten die Bindung von Galektin im Vergleich zu Laktose noch stärker reduzieren [André et al., 2001] und würden eine weitere Methode zur besseren Aufklärung des Effektes der Galektin-Bindung auf SOCE darstellen.

Eine direkte Bindung von Orai1 an Galektin-1, -3 oder -9 kann nicht gezeigt werden.

Dass die Interaktion von Galektin-1, -3 und -9 mit Orai1 nicht gezeigt werden konnte (s. Abb. 32D-E), unterstreicht die Vermutung, dass die Galektin-induzierte Modulation von SOCE und I_{CRAC} nicht durch eine direkte Interaktion zwischen Galektinen und Orai1 induziert wird. Darüber hinaus kann eine negative Koimmuno-Präzipitation aber nicht als Beweis für das Nichtvorhandensein einer möglichen Interaktion herangezogen werden, da eine zu schwache Bindung bzw. ungeeignete Bedingungen während der Aufreinigung eine Koimmunpräzipitation ebenfalls verhindern können. Zusätzlich käme auch Galektin-8, dessen Expression im Thymus bereits gezeigt wurde [Tribulatti et al., 2009], als möglicher Interaktionspartner für Orai1 in Betracht und sollte zur endgültigen Beurteilung einer möglichen Interaktion von Galektinen mit Orai1 noch getestet werden.

5.10 Regulation der Expression von Orai1 und Orai3

5.10.1 Die Promotoraktivität von Orai1 und Orai3

Die Promotoraktivität von Orai1 und Orai3 ist ähnlich.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Redox-Sensitivitäten und unterschiedlichen Leitfähigkeiten beeinflussen die relativen Expressionsverhältnisse von Orai1 und Orai3 den Orai-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom. Obwohl Orai3 im Vergleich zu Orai1 in vielen Zelltypen deutlich schwächer exprimiert wird [Stanisz et al., 2014] (s. Abb. 33A), ergaben sich beim Vergleich der Promotorstärke von Orai1 und Orai3 weder in HEK293- noch in SKMEL5-Zellen signifikante Unterschiede (s. Abb. 33B).

Unterschiedliche Expressionsstärken bei ähnlicher Promotoraktivität können neben den bekannten Regulationsmechanismen wie alternativer Initiierung der Transkription, alternativem Splicing, alternativer Polyadenylierung und alternativer Initiierung der Translation [de Klerk and 't Hoen, 2015] sowie epigenetischen Faktoren [Lim et al., 2013] auch aus einer miRNA-induzierten Destabilisierung oder veränderten Translationseffizienz der mRNA resultieren.

In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss von miRNAs mit potentiellen Zielsequenzen in der 3'UTR von Orai3 getestet.

Neben den Orai3-3'UTR-bindenden miRNAs wurde auch die heterologe Expression der putativen miRNA hsa-miR-4687 untersucht, die in der 5'UTR von STIM1 kodiert ist und wegen der theoretisch simultanen Expression mit STIM1 interessant war. Während die heterologe Expression von hsa-miR-34c, -449a sowie der Positivkontrolle -37a aus klonierten DNA-Sequenzen über Northern Blot bestätigt werden konnte, war der Nachweis der Expression von hsa-miR-4687 mit den verwendeten Sonden nicht möglich (s. Abb. 33C). Obwohl die Expression von hsa-miR-4687 mittels RNA-Sequenzierung bereits gezeigt werden konnte [Persson et al., 2011], war die Expression von hsa-miR4687 in dem verwendeten Vektor pSG5 nicht erfolgreich.

5.10.2 Einfluss von miRNAs auf die Expression von Orai3

Die Expression von Genen gekoppelt an ein kurzes Stück der Orai3-3'UTR wird durch hsa-miR-449a signifikant reduziert.

Der Einfluss der getesteten miRNAs auf die Stabilität bzw. Translationseffizienz der Orai3-mRNA und damit die Expression von Orai3 wurde durch Fusion der Orai3-3'UTR mit der Sequenz der Firefly-Luciferase getestet. Durch Vergleich mit dem Einfluss des miRNA-freien pSG5-Leervektors, wurde für den Einfluss jeder miRNA/mimic der relative Luciferaseaktivitätsquotient bestimmt.

Dabei fiel deutlich auf, dass die Koexpression von hsa-miR-34c und hsa-miR-449a auch zusammen mit dem Luciferase-Reportervektor ohne integrierte Orai3-3'UTR bereits zu einer ~ 30 % Reduktion des relativen Luciferaseaktivitätsquotienten führte. Hsa-miR-449a und hsa-miR-34c teilen sich die gleiche Zielsequenz und sollten deshalb auch ähnliche modulatorische Effekte zeigen.

Da jeweils das relative Verhältnis von Firefly- zu Renilla-Luciferaseaktivität gemessen wurde, könnte eine Reduktion des relativen Luciferaseaktivitätsquotienten entweder durch eine Erniedrigung der Firefly- oder Erhöhung der Renilla-Luciferaseaktivität entstanden sein. Wahrscheinlich scheint vor allem ein modulatorischer Einfluss von hsa-miR-449a und hsa-miR-34c auf Regulatoren von Transkription oder Translation der beiden Reportergene. Zu den Ursachen einer solchen Modulation könnte z. B. eine miRNA-bedingt verminderte Translation CMV-spezifischer Transkriptionsfaktoren gehören. Da die enzymatische Aktivität der Firefly-Luciferase im Gegensatz zu der, der Renilla-Luciferase ATP- und Mg^{+} -abhängig ist [Sherf et al., 1996], könnte auch ein Einfluss der miRNA auf entsprechende Regulatoren des Energiehaushaltes bzw. der Mg^{+} -Homöostase eine veränderte Luciferaseaktivität nach sich ziehen.

Wird der Effekt der koexprimierten miRNAs auf den relativen Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors ohne integrierte Orai3-3'UTR mit der des Luciferase-Reportervektors mit integrierter Orai3-3'UTR verglichen, führte von den drei getesteten miRNAs nur die Koexpression mit hsa-miR-449a zu einer signifikanten Reduktion

des relativen Luciferaseaktivitätsquotienten im Vergleich zur Kontrolle.

Durch Mutation der Bindestelle für hsa-miR-449a konnte der relative Luciferaseaktivitätsquotient zwar leicht angehoben werden, zeigte jedoch nicht das Niveau des relativen Luciferaseaktivitätsquotienten des Luciferase-Reportervektors ohne Orai3-3'UTR (s. Abb. 33D). Durch welche Mechanismen der translationseffizienz-vermindernde bzw. destabilisierende Einfluss der hsa-miR-449a auf die Orai3-3'UTR auch nach Mutation der Bindestelle erhalten blieb, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden.

Die Expression von Genen gekoppelt an ein kurzes Stück der Orai3-3'UTR wird tendenziell auch durch miRNA-mimics reduziert.

Wie die Plasmid-basierte Expression der miRNAs, führte auch die die Kotransfektion mit miRNA-mimics analog zu hsa-miR-661a und hsa-miR-449a zu einer tendenziellen Reduktion des relativen Luciferaseaktivitätsquotienten (s. Abb. 33E). Wegen der Instabilität der mimics in Kombination mit Plasmid-DNA wurde sequenziell transfiziert, was jedoch zu einer hohen Variabilität bei den Messergebnissen und deshalb vermutlich nicht zu signifikanten Effekten führte.

Die Expression von Genen gekoppelt an die vollständige Orai3-3'UTR wird durch miRNAs nicht stärker reduziert, als die von Genen gekoppelt an die kurze Orai3-3'UTR.

Auch bei Kopplung der Firefly-Luciferase-Sequenz an die vollständige Orai3-3'UTR, welche eine zweite Bindestelle für hsa-miR-34c und hsa-miR-449a sowie hsa-miR-148a beinhaltet, hatte nur die Überexpression von hsa-miRNA-449a einen signifikanten Einfluss auf die relative Translationseffizienz bzw. Stabilität der gekoppelten Reporter-gen-mRNA damit die Expression der Firefly-Luciferase (s. Abb. 34A) .

Auch wenn mehrere miRNA-Bindestellen zu einer kooperativen Verstärkung der miRNA-vermittelten Modulation der Translationseffizienz bzw. Stabilität der mRNA führen können, liegen die Bindestellen von hsa-miR-449a für eine Kooperativität zu weit auseinander. Durch die eher mittige Lage wird die Bindungswahrscheinlichkeit für die zweite Bindestelle zusätzlich herabgesetzt [Grimson et al., 2007]. Vermutlich liegt darin der Grund, weshalb bei Kopplung des Firefly-Luciferase-Gens an die vollständige Orai3-3'UTR mit der hsa-miR-449a kaum stärkere Effekte auf den relativen Luciferaseaktivitätsquotienten erzielt werden konnten, als bei Kopplung des Firefly-Luciferase-Gens an die kürzere Orai3-3'UTR.

Auch wenn durch Mutation der Bindestelle die Reduktion des relativen Luciferaseaktivitätsquotienten durch hsa-miR-449a nicht aufgehoben werden konnte, weisen die Ergebnisse der drei unabhängigen experimentellen Ansätze mit kurzer und vollständiger 3'UTR sowie miRNA-mimics in die gleiche Richtung und zeigen den translationseffizienz-vermindernden bzw. destabilisierenden Einfluss der hsa-miR-449a auf die Orai3-3'UTR-gekoppelte mRNA.

Die Konsistenz der Ergebnisse bei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen reduziert die Wahrscheinlichkeit eines unspezifischen Effekts. Sie deutet eher auf weitere putative

Bindestellen als mögliche Erklärung für die hsa-miR-449a vermittelte Reduktion des relativen Luciferaseaktivitätsquotienten auch nach Mutation der Bindestelle hin.

Durch Überexpression von hsa-miR-449a wird das relative mRNA-Level von Orai3 nicht signifikant reduziert.

Da kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand, konnte mittels qRT-PCR nur der Effekt von hsa-miR-449a auf die Stabilität der mRNA von Orai3 untersucht werden. Während man bei Überexpression von hsa-miR-449a, abgeleitet von den Ergebnissen der Luciferaseaktivitäts-Messungen, eine Herunterregulation von Orai3 erwarten würde, führte die Überexpression von hsa-miR-449a in HEK293T-Zellen zu einem tendenziell erhöhten und in HEK293-Zellen zu einem tendenziell leicht erniedrigten mRNA-Level von Orai3 im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle (s. Abb. 34B). In keinem der beiden Zellsysteme waren diese Unterschiede signifikant.

Orai3 wird in beiden Systemen sehr schwach exprimiert (HEK293T: $2^{-\Delta C_q} = 0,01$; HEK293: $2^{-\Delta C_q} = 0,03$). Vermutlich deshalb waren die Unterschiede in den $2^{-\Delta C_q}$ -Werten zwischen zwei Messungen gleicher Bedingung zum Teil so groß, wie der Unterschied zwischen Leervektor-Kontrolle und der Messung bei Überexpression der miRNA. Es ist also nicht eindeutig zu beurteilen, ob die fehlende Signifikanz beim Einfluss der hsa-miR-449a-Überexpression in HEK293T- und HEK293-Zellen auf das mRNA-Level von Orai3, einen Einfluss der betreffenden miRNA auch wirklich ausschließt. Die Überexpression von hsa-miR-449a in einer Zelllinie, die ein deutlich höheres, endogenes Orai3-mRNA-Level aufweist, sollte den nächsten Schritt darstellen, um den Einfluss von hsa-miR-449a auf die Stabilität der Orai3-mRNA abschließend beurteilen zu können.

Da die Transfektionseffizienz des pSG5-Vektors nur anhand der miRNA-Expression in HEK293T-Zellen getestet wurde, konnten keine Aussagen über die Expressionsstärke der kodierten miRNA in HEK293-Zellen getroffen werden. Durch Expression der miRNA in einem bicistronischen Vektor, der gleichzeitig ein Reportergen wie GFP exprimiert, könnten mit parallelen Northernblot-Analysen und Fluoreszenzmessungen optimale Transfektionsbedingungen für eine maximale Expression der miRNA ermittelt werden.

Während die perfekte Basenpaarung an eine UTR zur Degradation der gekoppelten mRNA führt, kann eine miRNA bei partieller Komplementarität auch lediglich zu einer Translationshemmung und damit Erniedrigung der Translationseffizienz führen. Obwohl die Translationshemmung nicht zu einem veränderten mRNA-Level führt, bewirkt sie dennoch ein verändertes Protein-Level des gekoppelten Gens. Auch wenn neuere Studien zeigen, dass der überwiegende Teil der regulatorisch wirkenden miRNAs bei Bindung zu einer Destabilisierung der Ziel-UTR-gekoppelten mRNA führt [Guo et al., 2010], besteht die Möglichkeit, dass die Bindung der hsa-miR-449a an die Orai3-3'UTR lediglich eine Translationshemmung bewirkt und deshalb zwar einen Effekt auf das relative Protein-Level, nicht aber das mRNA-Level gekoppelter Gene zeigt.

Die Expression von Genen gekoppelt an die Orai3-3'UTR wird auch durch endogen exprimierte Moleküle reduziert.

Beim Zusammenfassen aller Messungen wurde darüber hinaus deutlich, dass die Kopp-
lung der kurzen Orai3-3'UTR mit dem Firefly-Luciferase-Gen in HEK293T-Zellen auch
ohne zusätzliche Expression einer miRNA, zu einer signifikanten Reduktion des relativen
Luciferaseaktivitätsquotienten im Vergleich zum Luciferase-Reportervektor ohne gekoppelte
Orai3-3'UTR führte (s. Abb. 34C). Es scheint also bereits endogen exprimierte Moleküle
zu geben, die an die Orai3-3'UTR binden und die Stabilität bzw. Translationseffizienz
der transkribierten mRNA beeinflussen. Dazu könnten auch endogen exprimierte miRNAs
zählen.

Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit mehrere unabhängige Hinweise für einen spezifi-
schen, regulatorischen Einfluss der hsa-miR-449a auf die Stabilität bzw. Translationseffizienz
der Orai3-mRNA liefern, konnte dieser im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig bewiesen
werden.

Da hsa-miR-449a auch unspezifische Effekte auf die Aktivität der verwendeten Reporter-
Luciferasen zeigte, könnte die Verwendung eines alternativen Luciferase-Reportervektors
den spezifischen Effekt von hsa-miR-449a auf die Expression Orai3-3'UTR-gekoppelter
Gene möglicherweise besser aufdecken. Die Auswahl des optimalen Zellsystems könnte
dabei den Nachweis reduzierter, endogener Orai3-mRNA-Level zusätzlich erleichtern.

Nicht zuletzt die Modulation der Expression Orai3-3'UTR-gekoppelter Gene durch
endogen exprimierte Moleküle zeigt das regulatorische Potential, das auch durch miRNAs
vermittelt werden kann. Wegen des entscheidenden Einflusses, den der relative Anteil von
Orai1 und Orai3 auf die Redox-Sensitivität von Orai1- und Orai3-enthaltenden Kanälen
hat, ist er vermutlich besonders für eine angemessene Immunzellfunktion in entzündetem
Gewebe wichtig. Dies verleiht der Aufklärung feinregulatorischer Mechanismen beteiligt
an Transkription, Translation und Proteinbiosynthese und damit dem Verständnis aller
Zusammenhänge, die zu einer physiologischen und angemessenen Immunantwort führen,
eine besondere Bedeutung.

Gerade im Kontext mit Autoimmunerkrankungen und Krebs ist die Aufklärung dieser
Feinregulation nicht nur von Interesse für die Grundlagenforschung, sondern dient auch dem
Verständnis pathologischer Zustände und als Ausgangspunkt zur Entwicklung zukünftiger
therapeutischer Ansätze.

Literaturverzeichnis

- André, S., Kaltner, H., Manning, J. C., Murphy, P. V., and Gabius, H.-J. (2015). Lectins: Getting Familiar with Translators of the Sugar Code. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(2):1788–1823.
- André, S., Pieters, R. J., Vrasidas, I., Kaltner, H., Kuwabara, I., Liu, F. T., Liskamp, R. M., and Gabius, H. J. (2001). Wedgelike glycodendrimers as inhibitors of binding of mammalian galectins to glycoproteins, lactose maxiclusters, and cell surface glycoconjugates. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 2:822–830.
- Angata, T., Ishii, T., Motegi, T., Oka, R., Taylor, R. E., Soto, P. C., Chang, Y.-C., Secundino, I., Gao, C.-X., Ohtsubo, K., Kitazume, S., Nizet, V., Varki, A., Gemma, A., Kida, K., and Taniguchi, N. (2013). Loss of Siglec-14 reduces the risk of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(17):3199–210.
- Angata, T. and Varki, A. (2002). Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related α -Keto Acids: An Evolutionary Perspective. *Chemical Reviews*, 102(2):439–470.
- Avril, T., Floyd, H., Lopez, F., Vivier, E., and Crocker, P. R. (2004). The membrane-proximal immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif is critical for the inhibitory signaling mediated by Siglecs-7 and -9, CD33-related Siglecs expressed on human monocytes and NK cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(11):6841–9.
- Avril, T., Wagner, E. R., Willison, H. J., and Crocker, P. R. (2006). Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 7 mediates selective recognition of sialylated glycans expressed on *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides. *Infection and immunity*, 74(7):4133–41.
- Baba, Y., Nishida, K., Fujii, Y., Hirano, T., Hikida, M., and Kurosaki, T. (2008). Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nature immunology*, 9(1):81–8.
- Baeuerle, P. A. and Huttner, W. B. (1986). Chlorate is a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 141(2):870–877.

- Bandala-Sanchez, E., Zhang, Y., Reinwald, S., Dromey, J. A., Lee, B.-H., Qian, J., Böhmer, R. M., and Harrison, L. C. (2013). T cell regulation mediated by interaction of soluble CD52 with the inhibitory receptor Siglec-10. *Nature immunology*, 14(7):741–8.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2):215–33.
- Baryshnikov, S. G., Pulina, M. V., Zulian, A., Linde, C. I., and Golovina, V. A. (2009). Orail, a critical component of store-operated Ca^{2+} entry, is functionally associated with $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and plasma membrane Ca^{2+} pump in proliferating human arterial myocytes. *American journal of physiology. Cell physiology*, 297(5):C1103–12.
- Baycin-Hizal, D., Gottschalk, A., Jacobson, E., Mai, S., Wolozny, D., Zhang, H., Krag, S. S., and Betenbaugh, M. J. (2014). Physiologic and pathophysiologic consequences of altered sialylation and glycosylation on ion channel function. *Biochemical and biophysical research communications*, 453(2):243–53.
- Beech, D. J., Xu, S. Z., McHugh, D., and Flemming, R. (2003). TRPC1 store-operated cationic channel subunit. *Cell Calcium*, 33(February):433–440.
- Belisle, J. A., Horibata, S., Jennifer, G. A. A., Petrie, S., Kapur, A., André, S., Gabius, H.-J., Rancourt, C., Connor, J., Paulson, J. C., and Patankar, M. S. (2010). Identification of Siglec-9 as the receptor for MUC16 on human NK cells, B cells, and monocytes. *Molecular cancer*, 9(1):118.
- Bergmeier, W., Weidinger, C., Zee, I., and Feske, S. (2013). Emerging roles of store-operated Ca^{2+} entry through STIM and ORAI proteins in immunity, hemostasis and cancer. *Channels (Austin, Tex.)*, 7(5):379–91.
- Bi, S. and Baum, L. G. (2009). Sialic acids in T cell development and function. *Biochimica et biophysica acta*, 1790(12):1599–610.
- Bird, G. S., Hwang, S.-Y., Smyth, J. T., Fukushima, M., Boyles, R. R., and Putney, J. W. (2009). STIM1 is a calcium sensor specialized for digital signaling. *Current biology : CB*, 19(20):1724–9.
- Bochner, B. S., Alvarez, R. a., Mehta, P., Bovin, N. V., Blixt, O., White, J. R., and Schnaar, R. L. (2005). Glycan array screening reveals a candidate ligand for Siglec-8. *Journal of Biological Chemistry*, 280:4307–4312.
- Bochner, B. S. and Zimmermann, N. (2015). Role of siglecs and related glycan-binding proteins in immune responses and immunoregulation. *The Journal of allergy and clinical immunology*.
- Bogeski, I., Kummerow, C., Al-Ansary, D., Schwarz, E. C., Koehler, R., Kozai, D., Takahashi, N., Peinelt, C., Griesemer, D., Bozem, M., Mori, Y., Hoth, M., and Niemeyer, B. A.

- (2010). Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling. *Science signaling*, 3(115):ra24.
- Boscher, C., Dennis, J. W., and Nabi, I. R. (2011). Glycosylation, galectins and cellular signaling. *Current opinion in cell biology*, 23(4):383–92.
- Brandman, O., Liou, J., Park, W. S., and Meyer, T. (2007). STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} levels. *Cell*, 131(7):1327–39.
- Bresalier, R. S., Rockwell, R. W., Dahiya, R., Duh, Q. Y., and Kim, Y. S. (1990). Cell surface sialoprotein alterations in metastatic murine colon cancer cell lines selected in an animal model for colon cancer metastasis. *Cancer research*, 50(4):1299–307.
- Brewer, C. (2002). Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin–saccharide-mediated cellular interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(5):616–623.
- Brinkman-Van der Linden, E. C. and Varki, A. (2000). New aspects of siglec binding specificities, including the significance of fucosylation and of the sialyl-Tn epitope. Sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins. *The Journal of biological chemistry*, 275(12):8625–32.
- Buckler, A. J., Vie, H., Sonenshein, G. E., and Miller, R. A. (1988). Defective T lymphocytes in old mice. Diminished production of mature c-myc RNA after mitogen exposure not attributable to alterations in transcription or RNA stability. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 140(7):2442–6.
- Bull, V. H. and Thiede, B. (2012). Proteome analysis of tunicamycin-induced ER stress. *Electrophoresis*, 33(12):1814–23.
- Cahalan, M. D. (2009). STIMulating store-operated Ca^{2+} entry. *Nature cell biology*, 11(6):669–77.
- Cahalan, M. D., Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Roos, J., and Stauderman, K. A. (2007). Molecular basis of the CRAC channel. *Cell calcium*, 42(2):133–44.
- Cai, X. (2007). Molecular evolution and structural analysis of the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel subunit, Orai. *Journal of molecular biology*, 368(5):1284–91.
- Campanero-Rhodes, M. A., Childs, R. A., Kiso, M., Komba, S., Le Narvor, C., Warren, J., Otto, D., Crocker, P. R., and Feizi, T. (2006). Carbohydrate microarrays reveal sulphation as a modulator of siglec binding. *Biochemical and biophysical research communications*, 344(4):1141–6.

- Cattaneo, V., Tribulatti, M. V., Carabelli, J., Carestia, A., Schattner, M., and Campetella, O. (2014). Galectin-8 elicits pro-inflammatory activities in the endothelium. *Glycobiology*, 24(10):966–73.
- Cha, S.-k., Ortega, B., Kurosu, H., Rosenblatt, K. P., Kuro-o, M., and Huang, C.-l. (2008). Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *PNAS*, 75390(14).
- Chang, W.-C., Di Capite, J., Singaravelu, K., Nelson, C., Halse, V., and Parekh, A. B. (2008). Local Ca^{2+} influx through Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels stimulates production of an intracellular messenger and an intercellular pro-inflammatory signal. *The Journal of biological chemistry*, 283(8):4622–31.
- Chen, C.-Z., Li, L., Lodish, H. F., and Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5654):83–6.
- Chen, Y.-F., Chiu, W.-T., Chen, Y.-T., Lin, P.-Y., Huang, H.-J., Chou, C.-Y., Chang, H.-C., Tang, M.-J., and Shen, M.-R. (2011). Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(37):15225–30.
- Cheng, K. T., Liu, X., Ong, H. L., Swaim, W., and Ambudkar, I. S. (2011). Local Ca^{2+} entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca^{2+} signals required for specific cell functions. *PLoS biology*, 9(3):e1001025.
- Cheng, K. T., Ong, H. L., Liu, X., and Ambudkar, I. S. (2013). Contribution and regulation of TRPC channels in store-operated Ca^{2+} entry. *Current topics in membranes*, 71:149–79.
- Chilsont, O. P., Boylston, A. W., and Crumpton, M. J. (1984). Phaseolus vulgaris phytohaemagglutinin (PHA) binds to the human T lymphocyte antigen receptor. *The EMBO journal*, 3(13):3239–3245.
- Christiansen, M. N., Chik, J., Lee, L., Anugraham, M., Abrahams, J. L., and Packer, N. H. (2014). Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics*, 14(4-5):525–46.
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6):1047–58.
- Cobb, B. S., Hertweck, A., Smith, J., O’Connor, E., Graf, D., Cook, T., Smale, S. T., Sakaguchi, S., Livesey, F. J., Fisher, A. G., and Merkenschlager, M. (2006). A role for Dicer in immune regulation. *The Journal of experimental medicine*, 203(11):2519–27.
- Cobb, B. S., Nesterova, T. B., Thompson, E., Hertweck, A., O’Connor, E., Godwin, J., Wilson, C. B., Brockdorff, N., Fisher, A. G., Smale, S. T., and Merkenschlager, M. (2005). T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *The Journal of experimental medicine*, 201(9):1367–73.

- Collins, B. E., Smith, B. a., Bengtson, P., and Paulson, J. C. (2006). Ablation of CD22 in ligand-deficient mice restores B cell receptor signaling. *Nature immunology*, 7(2):199–206.
- Cooper, G. M. (2000). Gene Function in Eukaryotes. In *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition*. Sinauer Associates.
- Crocker, P. R., Paulson, J. C., and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 7(4):255–66.
- Crocker, P. R. and Varki, A. (2001). Siglecs in the immune system. *Immunology*, 103:137–145.
- Csutora, P., Su, Z., Kim, H. Y., Bugrim, A., Cunningham, K. W., Nuccitelli, R., Keizer, J. E., Hanley, M. R., Blalock, J. E., and Marchase, R. B. (1999). Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(1):121–126.
- Cummings, R. D. and Etzler, M. E. (2009). Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. In *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cummings, R. D. and McEver, R. P. (2009). C-type Lectins. In *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Czyż, A., Brutkowski, W., Fronk, J., Duszyński, J., and Zabłocki, K. (2009). Tunicamycin desensitizes store-operated Ca²⁺ entry to ATP and mitochondrial potential. *Biochemical and biophysical research communications*, 381(2):176–80.
- Dahms, N. (2002). P-type lectins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1572(2-3):317–340.
- Dall’Olio, F. and Chiricolo, M. (2001a). Sialyltransferases in cancer. *Glycoconjugate Journal*, 18(11-12):841–850.
- Dall’Olio, F. and Chiricolo, M. (2001b). Sialyltransferases in cancer. *Glycoconjugate journal*, 18(11-12):841–50.
- Dall’Olio, F., Malagolini, N., di Stefano, G., Minni, F., Marrano, D., and Serafini-Cessi, F. (1989). Increased CMP-NeuAc:Gal beta 1,4GlcNAc-R alpha 2,6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 44(3):434–9.
- Dall’Olio, F., Malagolini, N., Trinchera, M., and Chiricolo, M. (2014). Sialosignaling: sialyltransferases as engines of self-fueling loops in cancer progression. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(9):2752–64.

- Dalziel, M., Crispin, M., Scanlan, C. N., Zitzmann, N., and Dwek, R. A. (2014). Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6166):1235681.
- de Klerk, E. and 't Hoen, P. A. (2015). Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing. *Trends in Genetics*, 31(3):128–139.
- Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S., and Dennis, J. W. (2001). Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*, 409(6821):733–9.
- Di Capite, J., Nelson, C., Bates, G., and Parekh, A. B. (2009). Targeting Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel channels and leukotriene receptors provides a novel combination strategy for treating nasal polyposis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 124(5):1014–21.e1–3.
- Di Capite, J. L., Bates, G. J., and Parekh, A. B. (2011). Mast cell CRAC channel as a novel therapeutic target in allergy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 11(1):33–8.
- Di Lella, S., Sundblad, V., Cerliani, J. P., Guardia, C. M., Estrin, D. A., Vasta, G. R., and Rabinovich, G. A. (2011). When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry*, 50(37):7842–57.
- Drickamer, K. and Taylor, M. E. (2003). Identification of lectins from genomic sequence data. *Methods in enzymology*, 362:560–7.
- Dubois, C., Vanden Abeele, F., and Prevarskaya, N. (2013). Targeting apoptosis by the remodelling of calcium-transporting proteins in cancerogenesis. *The FEBS journal*, 280(21):5500–10.
- Engering, A., Geijtenbeek, T. B. H., van Vliet, S. J., Wijers, M., van Liempt, E., Demaur-ex, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C. G., Piguet, V., and van Kooyk, Y. (2002). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(5):2118–26.
- Erler, I., Al-Ansary, D. M. M., Wissenbach, U., Wagner, T. F. J., Flockerzi, V., and Niemeyer, B. A. (2006). Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *The Journal of biological chemistry*, 281(50):38396–404.
- Faouzi, M., Hague, F., Potier, M., Ahidouch, A., Sevestre, H., and Ouadid-Ahidouch, H. (2011). Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *Journal of cellular physiology*, 226(2):542–51.

- Feske, S. (2009). Orai1 and STIM1 deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca^{2+} entry in the immune system and beyond. *Immunological reviews*, 231(1):189–209.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.-H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., and Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090):179–85.
- Feske, S., Skolnik, E. Y., and Prakriya, M. (2012). Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nature reviews. Immunology*, 12(7):532–47.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y., and Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature reviews. Immunology*, 2(2):77–84.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews. Genetics*, 9(2):102–14.
- Flourakis, M., Lehen'kyi, V., Beck, B., Raphaël, M., Vandenberghe, M., Abeele, F. V., Roudbaraki, M., Lepage, G., Mauroy, B., Romanin, C., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskeya, N. (2010). Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell death & disease*, 1:e75.
- Floyd, H., Ni, J., Cornish, A. L., Zeng, Z., Liu, D., Carter, K. C., Steel, J., and Crocker, P. R. (2000). Siglec-8: A NOVEL EOSINOPHIL-SPECIFIC MEMBER OF THE IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2):861–866.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437(1-2):55–75.
- Freeman, S., Birrell, H. C., D'Alessio, K., Erickson-Miller, C., Kikly, K., and Camilleri, P. (2001). A comparative study of the asparagine-linked oligosaccharides on siglec-5, siglec-7 and siglec-8, expressed in a CHO cell line, and their contribution to ligand recognition. *European journal of biochemistry / FEBS*, 268(5):1228–37.
- Frischauf, I., Muik, M., Derler, I., Bergsmann, J., Fahrner, M., Schindl, R., Groschner, K., and Romanin, C. (2009). Molecular determinants of the coupling between STIM1 and Orai channels: differential activation of Orai1-3 channels by a STIM1 coiled-coil mutant. *The Journal of biological chemistry*, 284(32):21696–706.
- Fukuda, M., Hiraoka, N., Akama, T. O., and Fukuda, M. N. (2001). Carbohydrate-modifying sulfotransferases: structure, function, and pathophysiology. *The Journal of biological chemistry*, 276(51):47747–50.
- Fukushima, M., Tomita, T., Janoshazi, A., and Putney, J. W. (2012). Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of orai1 with distinct plasma membrane mobilities.

- Fuster, M. M. and Esko, J. D. (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature reviews. Cancer*, 5(7):526–42.
- Gao, P.-S., Shimizu, K., Grant, A. V., Rafaels, N., Zhou, L.-F., Hudson, S. A., Konno, S., Zimmermann, N., Araujo, M. I., Ponte, E. V., Cruz, A. A., Nishimura, M., Su, S.-N., Hizawa, N., Beaty, T. H., Mathias, R. A., Rothenberg, M. E., Barnes, K. C., and Bochner, B. S. (2010). Polymorphisms in the sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-8 (Siglec-8) gene are associated with susceptibility to asthma. *European journal of human genetics : EJHG*, 18(6):713–9.
- Garcia, G. G., Berger, S. B., Sadighi Akha, A. a., and Miller, R. a. (2005). Age-associated changes in glycosylation of CD43 and CD45 on mouse CD4 T cells. *European journal of immunology*, 35(2):622–31.
- Garcia, G. G. and Miller, R. a. (2001). Single-cell analyses reveal two defects in peptide-specific activation of naive T cells from aged mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166:3151–3157.
- Garner, O. B. and Baum, L. G. (2010). Galectin-glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling. *Biochemical Society transactions*, 36(Pt 6):1472–1477.
- Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E., and Schiff, C. (2002). Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20):13014–9.
- Geisler, C. and Jarvis, D. L. (2011). Letter to the Glyco-Forum: Effective glycoanalysis with Maackia amurensis lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology*, 21(8):988–993.
- Gessner, P., Riedl, S., Quentmaier, A., and Kemmner, W. (1993). Enhanced activity of CMP-neuAc:Gal beta 1-4GlcNAc:alpha 2,6-sialyltransferase in metastasizing human colorectal tumor tissue and serum of tumor patients. *Cancer letters*, 75(3):143–9.
- Gong, Q., Anderson, C. L., January, C. T., and Zhou, Z. (2002). Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 283(1):H77–84.
- Goodnow, C. C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., and Vinuesa, C. G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*, 435(7042):590–7.
- Grimson, A., Farh, K. K.-H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., and Bartel, D. P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell*, 27(1):91–105.

- Grossmann, A., Maggio-Price, L., Jinneman, J. C., and Rabinovitch, P. S. (1991). Influence of aging on intracellular free calcium and proliferation of mouse T-cell subsets from various lymphoid organs. *Cellular immunology*, 135(1):118–31.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*, 260(6):3440–50.
- Gu, J., Isaji, T., Xu, Q., Kariya, Y., Gu, W., Fukuda, T., and Du, Y. (2012). Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion. *Glycoconjugate journal*, 29(8-9):599–607.
- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., and Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308):835–40.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Feske, S., Cruz-Guilloty, F., Oh-hora, M., Neems, D. S., Hogan, P. G., and Rao, A. (2007). Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *The Journal of biological chemistry*, 282(22):16232–43.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Oh-Hora, M., Hogan, P. G., Lamperti, E. D., Yamashita, M., Gelinis, C., Neems, D. S., Sasaki, Y., Feske, S., Prakriya, M., Rajewsky, K., and Rao, A. (2008). Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking ORAI1. *Molecular and cellular biology*, 28(17):5209–22.
- Harduin-Lepers, A., Krzewinski-Recchi, M.-A., Colomb, F., Foulquier, F., Groux-Degroote, S., and Delannoy, P. (2012). Sialyltransferases functions in cancers. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 4:499–515.
- Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M.-A., Samyn-Petit, B., Julien, S., and Delannoy, P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83(8):727–737.
- Hart, G. W. (1997). Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annual review of biochemistry*, 66:315–35.
- Harvey, B. E., Toth, C. A., Wagner, H. E., Steele, G. D., and Thomas, P. (1992). Sialyltransferase activity and hepatic tumor growth in a nude mouse model of colorectal cancer metastases. *Cancer research*, 52(7):1775–9.
- Hennet, T., Chui, D., Paulson, J. C., and Marth, J. D. (1998). Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8):4504–9.
- Hirabayashi, J. (2002). Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1572(2-3):232–254.

- Hogan, P. G., Lewis, R. S., and Rao, A. (2010). Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annual review of immunology*, 28:491–533.
- Holzmann, C., Kilch, T., Kappel, S., Armbrüster, A., Jung, V., Stöckle, M., Bogeski, I., Schwarz, E. C., and Peinelt, C. (2013). ICRAC controls the rapid androgen response in human primary prostate epithelial cells and is altered in prostate cancer. *Oncotarget*, 4(11):2096–107.
- Homer (1990). The Iliad. *Viking, New York*, pages Book 5 line 859, Book 8 line 449.
- Hoover, P. J. and Lewis, R. S. (2011). Stoichiometric requirements for trapping and gating of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(32):13299–304.
- Hoth, M. and Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355:353–356.
- Hoth, M. and Penner, R. (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *The Journal of physiology*, 465:359–386.
- Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M., and Long, S. B. (2012). Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6112):1308–13.
- Huang, D. C., Hahne, M., Schroeter, M., Frei, K., Fontana, A., Villunger, A., Newton, K., Tschopp, J., and Strasser, A. (1999). Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26):14871–6.
- Imboden, J. B. and Stobo, J. D. (1985). Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *The Journal of experimental medicine*, 161(March):446–456.
- Irvine, R. (1990). Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates - a possible mechanism. *FEBS Letters*, 263(1):5–9.
- Izquierdo, J.-H., Bonilla-Abadía, F., Cañas, C. A., and Tobón, G. J. (2013). Calcium, channels, intracellular signaling and autoimmunity. *Reumatología clínica*, 10(1):43–7.
- Jandus, C., Boligan, K. F., Chijioke, O., Liu, H., Dahlhaus, M., Démoulin, T., Schneider, C., Wehrli, M., Hunger, R. E., Baerlocher, G. M., Simon, H.-U., Romero, P., Münz, C., and von Gunten, S. (2014). Interactions between Siglec-7/9 receptors and ligands influence NK cell-dependent tumor immunosurveillance. *The Journal of clinical investigation*, 124(4):1810–20.

- Jones, C., Virji, M., and Crocker, P. R. (2003). Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. *Molecular Microbiology*, 49(5):1213–1225.
- Ju, T., Lanneau, G. S., Gautam, T., Wang, Y., Xia, B., Stowell, S. R., Willard, M. T., Wang, W., Xia, J. Y., Zuna, R. E., Laszik, Z., Benbrook, D. M., Hanigan, M. H., and Cummings, R. D. (2008). Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer research*, 68(6):1636–46.
- Kaufmann, M., Blaser, C., Takashima, S., Schwartz-Albiez, R., Tsuji, S., and Pircher, H. (1999). Identification of an alpha2,6-sialyltransferase induced early after lymphocyte activation. *International immunology*, 11(5):731–8.
- Kawasaki, T., Ii, M., Kozutsumi, Y., and Yamashina, I. (1986). Isolation and characterization of a receptor lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine from macrophages. *Carbohydrate research*, 151:197–206.
- Khadra, N., Bresson-bepoldin, L., Penna, A., Chaigne-delalande, B., and Ségui, B. (2011). CD95 triggers Orai1-mediated localized Ca^{2+} entry, regulates recruitment of protein kinase C (PKC) $\beta 2$, and prevents death-inducing signaling complex formation. *PNAS*, pages 2–7.
- Khanna, R., Myers, M. P., Lainé, M., and Papazian, D. M. (2001). Glycosylation increases potassium channel stability and surface expression in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 276(36):34028–34.
- Kidder, D., Richards, H. E., Ziltener, H. J., Garden, O. A., and Crocker, P. R. (2013). Sialoadhesin ligand expression identifies a subset of CD4+Foxp3- T cells with a distinct activation and glycosylation profile. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(6):2593–602.
- Kilch, T. (2012). *Bedeutung von N-Glykosylierungsmotiven für die Funktion des speicher-gesteuerten Calcium Einstroms Role of N-glycosylation motifs for the function of store operated calcium entry*. PhD thesis, Universität des Saarlandes.
- Kilch, T., Alansary, D., Peglow, M., Dörr, K., Rychkov, G., Rieger, H., Peinelt, C., and Niemeyer, B. a. (2013). Mutations of the Ca^{2+} -sensing stromal interaction molecule STIM1 regulate Ca^{2+} influx by altered oligomerization of STIM1 and by destabilization of the Ca^{2+} channel Orai1. *The Journal of biological chemistry*, 288(3):1653–64.
- Kim, K.-D., Srikanth, S., Tan, Y.-V., Yee, M.-K., Jew, M., Damoiseaux, R., Jung, M. E., Shimizu, S., An, D. S., Ribalet, B., Waschek, J. A., and Gwack, Y. (2014). Calcium signaling via Orai1 is essential for induction of the nuclear orphan receptor pathway to drive Th17 differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(1):110–22.

- Kim, V. N. and Nam, J.-W. (2006). Genomics of microRNA. *Trends in genetics : TIG*, 22(3):165–73.
- Kim, Y. H., Park, C.-S., Lim, D. H., Son, B. K., Kim, J. H., Ahn, S.-H., Bochner, B. S., Na, K., and Jang, T. Y. (2013). Antiallergic effect of anti-Siglec-F through reduction of eosinophilic inflammation in murine allergic rhinitis. *American journal of rhinology & allergy*, 27(3):187–91.
- Klein, A. and Roussel, P. (1998). O-acetylation of sialic acids. *Biochimie*, 80(1):49–57.
- Knibbsso, R. N., Goldstein, I. J., Ratcliffell, R. M., and Shibuyall, N. (1991). Characterization of the Carbohydrate Binding Specificity of the Leukoagglutinating Lectin from *Maacizia amurensis*. *The Journal of biological chemistry*.
- Koralov, S. B., Muljo, S. A., Galler, G. R., Krek, A., Chakraborty, T., Kanellopoulou, C., Jensen, K., Cobb, B. S., Merckenschlager, M., Rajewsky, N., and Rajewsky, K. (2008). Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell*, 132(5):860–74.
- Kornfeld, S., Rogers, J., and Gregory, W. (1971). The Lens Nature czdinaris of the Cell Receptor Site for Phytohemagglutinin *. *The Journal of biological chemistry*, 246(21):6581–6586.
- Kroesen, B.-J., Teteloshvili, N., Smigielska-Czepiel, K., Brouwer, E., Boots, A. M. H., van den Berg, A., and Kluiver, J. (2014). Immuno-miRs: Critical regulators of T-cell development, function and ageing. *Immunology*, 144(1):1–10.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews. Genetics*, 11(9):597–610.
- Laderach, D. J., Compagno, D., Toscano, M. A., Croci, D. O., Dergan-Dylon, S., Salatino, M., and Rabinovich, G. A. (2010). Dissecting the signal transduction pathways triggered by galectin-glycan interactions in physiological and pathological settings. *IUBMB life*, 62(1):1–13.
- Lajaunias, F., Dayer, J.-M., and Chizzolini, C. (2005). Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling. *European journal of immunology*, 35(1):243–51.
- Le Deist, F., Hivroz, C., Partiseti, M., Thomas, C., Buc, H. A., Oleastro, M., Belohradsky, B., Choquet, D., and Fischer, A. (1995). A primary T-cell immunodeficiency associated with defective transmembrane calcium influx. *Blood*, 85(4):1053–62.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rå dmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956):415–9.

- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*, 21(17):4663–70.
- Leunissen, E. H. P., Nair, A. V., Büll, C., Lefeber, D. J., van Delft, F. L., Bindels, R. J. M., and Hoenderop, J. G. J. (2013). The epithelial calcium channel TRPV5 is regulated differentially by klotho and sialidase. *The Journal of biological chemistry*, 288(41):29238–46.
- Lewis, B. P., Shih, I.-h., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., and Burge, C. B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*, 115(7):787–798.
- Lewis, R. S. (2001). Calcium Signaling Mechanisms in T-Lymphocytes. *Annual review of immunology*, 121(Figure 1):117–121.
- Li, Y. and Chen, X. (2012). Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 94(4):887–905.
- Li, Z., Liu, L., Deng, Y., Ji, W., Du, W., Xu, P., Chen, L., and Xu, T. (2011). Graded activation of CRAC channel by binding of different numbers of STIM1 to Orai1 subunits. *Cell research*, 21(2):305–15.
- Li, Z., Lu, J., Xu, P., Xie, X., Chen, L., and Xu, T. (2007). Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activation. *The Journal of biological chemistry*, 282(40):29448–56.
- Lim, P. S., Li, J., Holloway, A. F., and Rao, S. (2013). Epigenetic regulation of inducible gene expression in the immune system. *Immunology*, 139(3):285–93.
- Lin, F.-F., Elliott, R., Colombero, A., Gaida, K., Kelley, L., Moksa, A., Ho, S.-Y., Bykova, E., Wong, M., Rathanaswami, P., Hu, S., Sullivan, J. K., Nguyen, H. Q., and McBride, H. J. (2013). Generation and characterization of fully human monoclonal antibodies against human Orai1 for autoimmune disease. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 345(2):225–38.
- Lin, S., Kemmner, W., Grigull, S., and Schlag, P. M. (2002). Cell surface alpha 2,6 sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells. *Experimental cell research*, 276(1):101–10.
- Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T., and Meyer, T. (2007). Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca^{2+} store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22):9301–6.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., and Meyer, T. (2005). STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Current biology : CB*, 15(13):1235–41.

- Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., and Penner, R. (2007). CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca^{2+} channels with distinct functional properties. *Current biology : CB*, 17(9):794–800.
- Liu, F.-T., Patterson, R. J., and Wang, J. L. (2002). Intracellular functions of galectins. *Biochimica et biophysica acta*, 1572(2-3):263–73.
- Liu, F.-T. and Rabinovich, G. A. (2010). Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1183:158–82.
- Liu, Z., Swindall, A. F., Kesterson, R. a., Schoeb, T. R., Bullard, D. C., and Bellis, S. L. (2011). ST6Gal-I regulates macrophage apoptosis via α 2-6 sialylation of the TNFR1 death receptor. *The Journal of biological chemistry*, 286(45):39654–62.
- Lowe, J. B. (2003). Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. *Current opinion in cell biology*, 15(5):531–8.
- Luik, R. M., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M. M., and Lewis, R. S. (2008). Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature*, 454(7203):538–42.
- Luik, R. M., Wu, M. M., Buchanan, J., and Lewis, R. S. (2006). The elementary unit of store-operated Ca^{2+} entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *The Journal of cell biology*, 174(6):815–25.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5654):95–8.
- Lytton, J., Westlin, M., and Hanley, M. R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *The Journal of biological chemistry*, 266(26):17067–71.
- Ma, J., McCarl, C.-A., Khalil, S., Lüthy, K., and Feske, S. (2010). T-cell-specific deletion of STIM1 and STIM2 protects mice from EAE by impairing the effector functions of Th1 and Th17 cells. *European journal of immunology*, 40(11):3028–42.
- Ma, J., Simonovic, M., Qian, R., and Colley, K. J. (1999). Sialyltransferase Isoforms Are Phosphorylated in the Cis-medial Golgi on Serine and Threonine Residues in Their Luminal Sequences. *Journal of Biological Chemistry*, 274(12):8046–8052.
- Macauley, M. S., Crocker, P. R., and Paulson, J. C. (2014). Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nature reviews. Immunology*, 14(10):653–66.
- Macauley, M. S., Pfrengle, F., Rademacher, C., Nycholat, C. M., Gale, A. J., von Drygalski, A., and Paulson, J. C. (2013). Antigenic liposomes displaying CD22 ligands induce antigen-specific B cell apoptosis. *The Journal of clinical investigation*, 123(7):3074–83.

- Maley, F., Trimble, R. B., Tarentino, A. L., and Plummer, T. H. (1989). Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Analytical Biochemistry*, 180(2):195–204.
- Malik, M., Simpson, J. F., Parikh, I., Wilfred, B. R., Fardo, D. W., Nelson, P. T., and Estus, S. (2013). CD33 Alzheimer’s risk-altering polymorphism, CD33 expression, and exon 2 splicing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(33):13320–5.
- Marino, J. H., Tan, C., Davis, B., Han, E.-S., Hickey, M., Naukam, R., Taylor, A., Miller, K. S., Van De Wiele, C. J., and Teague, T. K. (2008). Disruption of thymopoiesis in ST6Gal I-deficient mice. *Glycobiology*, 18(9):719–26.
- Marth, J. D. and Grewal, P. K. (2008). Mammalian glycosylation in immunity. *Nature reviews. Immunology*, 8(11):874–87.
- Maul-Pavicic, A., Chiang, S. C. C., Rensing-Ehl, A., Jessen, B., Fauriat, C., Wood, S. M., Sjöqvist, S., Hufnagel, M., Schulze, I., Bass, T., Schamel, W. W., Fuchs, S., Pircher, H., McCarl, C.-A., Mikoshiba, K., Schwarz, K., Feske, S., Bryceson, Y. T., and Ehl, S. (2011). ORAI1-mediated calcium influx is required for human cytotoxic lymphocyte degranulation and target cell lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(8):3324–9.
- McCarl, C.-A., Khalil, S., Ma, J., Oh-hora, M., Yamashita, M., Roether, J., Kawasaki, T., Jairaman, A., Sasaki, Y., Prakriya, M., and Feske, S. (2010). Store-operated Ca^{2+} entry through ORAI1 is critical for T cell-mediated autoimmunity and allograft rejection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(10):5845–58.
- McCarl, C.-A., Picard, C., Khalil, S., Kawasaki, T., Röther, J., Papolos, A., Kutok, J., Hivroz, C., Ledest, F., Plogmann, K., Ehl, S., Notheis, G., Albert, M. H., Belohradsky, B. H., Kirschner, J., Rao, A., Fischer, A., and Feske, S. (2009). ORAI1 deficiency and lack of store-operated Ca^{2+} entry cause immunodeficiency, myopathy, and ectodermal dysplasia. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 124(6):1311–1318.e7.
- Mercer, J. C., Dehaven, W. I., Smyth, J. T., Wedel, B., Boyles, R. R., Bird, G. S., and Putney, J. W. (2006). Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orail or Orail2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *The Journal of biological chemistry*, 281(34):24979–90.
- Mignen, O., Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2007). STIM1 regulates Ca^{2+} entry via arachidonate-regulated Ca^{2+} -selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane. *The Journal of physiology*, 579(Pt 3):703–15.

- Mignen, O., Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2008a). Both Orai1 and Orai3 are essential components of the arachidonate-regulated Ca²⁺-selective (ARC) channels. *The Journal of physiology*, 586(1):185–95.
- Mignen, O., Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2008b). Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore. *The Journal of physiology*, 586(2):419–25.
- Mignen, O., Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2009). The molecular architecture of the arachidonate-regulated Ca²⁺-selective ARC channel is a pentameric assembly of Orai1 and Orai3 subunits. *The Journal of physiology*, 587(Pt 17):4181–97.
- Miller, R. A., Garcia, G., Kirk, C. J., and Witkowski, J. M. (1997). Early activation defects in T lymphocytes from aged mice. *Immunological reviews*, 160:79–90.
- Mitoma, J., Bao, X., Petryanik, B., Schaerli, P., Gauguier, J.-M., Yu, S.-Y., Kawashima, H., Saito, H., Ohtsubo, K., Marth, J. D., Khoo, K.-H., von Andrian, U. H., Lowe, J. B., and Fukuda, M. (2007). Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment. *Nature immunology*, 8(4):409–18.
- Monteith, G. R., McAndrew, D., Faddy, H. M., and Roberts-Thomson, S. J. (2007). Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport. *Nature reviews. Cancer*, 7(7):519–30.
- Moremen, K. W., Tiemeyer, M., and Nairn, A. V. (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function.
- Mori, Y. (2002). Transient Receptor Potential 1 Regulates Capacitative Ca²⁺ Entry and Ca²⁺ Release from Endoplasmic Reticulum in B Lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 195(6):673–681.
- Motiani, R. K., Hyzinski-García, M. C., Zhang, X., Henkel, M. M., Abdullaev, I. F., Kuo, Y.-H., Matrougui, K., Mongin, A. A., and Trebak, M. (2013). STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 465(9):1249–60.
- Muik, M., Fahrner, M., Schindl, R., Stathopoulos, P., Frischauf, I., Derler, I., Plenk, P., Lackner, B., Groschner, K., Ikura, M., and Romanin, C. (2011). STIM1 couples to ORAI1 via an intramolecular transition into an extended conformation. *The EMBO journal*, 30(9):1678–89.
- Nairn, A. V., York, W. S., Harris, K., Hall, E. M., Pierce, J. M., and Moremen, K. W. (2008). Regulation of glycan structures in animal tissues: transcript profiling of glycan-related genes. *The Journal of biological chemistry*, 283(25):17298–313.
- Nasirikenari, M., Segal, B. H., Ostberg, J. R., Urbasic, A., and Lau, J. T. (2006). Altered granulopoietic profile and exaggerated acute neutrophilic inflammation in mice with targeted deficiency in the sialyltransferase ST6Gal I. *Blood*, 108(10):3397–405.

- Nguyen, D. H., Hurtado-Ziola, N., Gagneux, P., and Varki, A. (2006). Loss of Siglec expression on T lymphocytes during human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(20):7765–70.
- Nichols, E. J., Manger, R., Hakomori, S., Herscovics, A., and Rohrschneider, R. L. (1985). Transformation by the v-fms Oncogene Product: Role of Glycosylational Processing and Cell surface Expression. *1985*.
- Noma, K., Kimura, K., Minatohara, K., Nakashima, H., Nagao, Y., Mizoguchi, A., and Fujiyoshi, Y. (2009). Triple N-glycosylation in the long S5-P loop regulates the activation and trafficking of the Kv12.2 potassium channel. *The Journal of biological chemistry*, 284(48):33139–50.
- Nowell, P. C. (1960). Phytohemagglutinin : An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes *. *Cancer research*.
- Nutku, E., Aizawa, H., Hudson, S. A., and Bochner, B. S. (2003). Ligation of Siglec-8: a selective mechanism for induction of human eosinophil apoptosis. *Blood*, 101(12):5014–20.
- O’Carroll, D., Mecklenbrauker, I., Das, P. P., Santana, A., Koenig, U., Enright, A. J., Miska, E. A., and Tarakhovsky, A. (2007). A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes & development*, 21(16):1999–2004.
- Oh-Hora, M., Yamashita, M., Hogan, P. G., Sharma, S., Lamperti, E., Chung, W., Prakriya, M., Feske, S., and Rao, A. (2008). Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nature immunology*, 9(4):432–43.
- O’Hanlon, T. P., Lau, K. M., Wang, X. C., and Lau, J. T. (1989). Tissue-specific expression of beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase. Transcript heterogeneity predicts a divergent polypeptide. *The Journal of biological chemistry*, 264(29):17389–94.
- Ohtsubo, K. and Marth, J. D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 126(5):855–67.
- Pangburn, M. K., Pangburn, K. L., Koistinen, V., Meri, S., and Sharma, A. K. (2000). Molecular mechanisms of target recognition in an innate immune system: interactions among factor H, C3b, and target in the alternative pathway of human complement. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(9):4742–51.
- Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K. C., Dolmetsch, R. E., and Lewis, R. S. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*, 136(5):876–90.

- Paulson, J. C., Weinstein, J., and Schauer, A. (1989). Tissue-specific expression of sialyltransferases. *The Journal of biological chemistry*, 264(19):10931–4.
- Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D. L., Beck, A., Nadler, M. J. S., Koblan-Huberson, M., Lis, A., Fleig, A., Penner, R., and Kinet, J.-P. (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nature cell biology*, 8(7):771–3.
- Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Safrina, O., Parker, I., and Cahalan, M. D. (2008). The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature*, 456(7218):116–20.
- Perillo, N. L., Pace, K. E., Seilhamer, J. J., and Baum, L. G. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, 378(6558):736–9.
- Persson, H., Kvist, A., Rego, N., Staaf, J., Vallon-Christersson, J., Luts, L., Loman, N., Jonsson, G., Naya, H., Hoglund, M., Borg, A., and Rovira, C. (2011). Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene. *Cancer research*, 71(1):78–86.
- Peters, B. P., Ebisu, S., Goldstein, I. J., and Flashner, M. (1979). Wheat Germ Agglutinin with Sialic Acid. *Society*, 18(24).
- Petit, D., Mir, A.-M., Petit, J.-M., Thisse, C., Delannoy, P., Oriol, R., Thisse, B., and Harduin-Lepers, A. (2010). Molecular phylogeny and functional genomics of beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferases that explain ubiquitous expression of st6gal1 gene in amniotes. *The Journal of biological chemistry*, 285(49):38399–414.
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., and Hogan, P. G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, 443(7108):230–3.
- Premack, B. A., McDonald, T. V., Cardner, P., and Gardner, P. (1994). Activation of Ca²⁺ current in Jurkat T cells following the depletion of Ca²⁺ stores by microsomal Ca(2+)-ATPase inhibitors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(11):5226–40.
- Putney, J. W. (1986). G. *Cell calcium*, 7(1):1–12.
- Rabinovich, G. A., Baum, L. G., Tinari, N., Paganelli, R., Natoli, C., Liu, F. T., and Iacobelli, S. (2002). Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends in immunology*, 23(6):313–20.
- Rabinovich, G. a. and Toscano, M. a. (2009). Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 9(5):338–52.
- Rabinovich, G. a., van Kooyk, Y., and Cobb, B. a. (2012). Glycobiology of immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1253:1–15.

- Rapoport, E. M., Pazynina, G. V., Sablina, M. A., Crocker, P. R., and Bovin, N. V. (2006). Probing sialic acid binding Ig-like lectins (siglecs) with sulfated oligosaccharides. *Biochemistry. Biokhimiĭja*, 71(5):496–504.
- Rayner, K. J. and Hennessy, E. J. (2013). Extracellular communication via microRNA: lipid particles have a new message. *Journal of lipid research*, 54(5):1174–81.
- Roberts-Thomson, S. J., Peters, A. A., Grice, D. M., and Monteith, G. R. (2010). ORAI-mediated calcium entry: mechanism and roles, diseases and pharmacology. *Pharmacology & therapeutics*, 127(2):121–30.
- Rohfritsch, P. F., Joosten, J. A. F., Krzewinski-Recchi, M.-A., Harduin-Lepers, A., Laporte, B., Juliant, S., Cerutti, M., Delannoy, P., Vliegenthart, J. F. G., and Kamerling, J. P. (2006). Probing the substrate specificity of four different sialyltransferases using synthetic beta-D-Galp-(1→4)-beta-D-GlcNAc-(1→2)-alpha-D-Manp-(1→O) (CH₂)₇CH₃ analogues general activating effect of replacing N-acetylglucosamine by N-propionylglucosamine. *Biochimica et biophysica acta*, 1760(4):685–92.
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., Velicelebi, G., and Stauderman, K. a. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *Journal of Cell Biology*, 169:435–445.
- Rossi, B., Espeli, M., Schiff, C., and Gauthier, L. (2006). Clustering of Pre-B Cell Integrins Induces Galectin-1-Dependent Pre-B Cell Receptor Relocalization and Activation. *The Journal of Immunology*, 177:796–803.
- Rossi, R. L., Rossetti, G., Wenandy, L., Curti, S., Ripamonti, A., Bonnal, R. J. P., Birolo, R. S., Moro, M., Crosti, M. C., Gruarin, P., Maglie, S., Marabita, F., Mascheroni, D., Parente, V., Comelli, M., Trabucchi, E., De Francesco, R., Geginat, J., Abrignani, S., and Pagani, M. (2011). Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4⁺ T cells by the microRNA miR-125b. *Nature immunology*, 12(8):796–803.
- Rubinstein, E., Cho, J. Y., Rosenthal, P., Chao, J., Miller, M., Pham, A., Aceves, S. S., Varki, A., and Broide, D. H. (2011). Siglec-F inhibition reduces esophageal eosinophilia and angiogenesis in a mouse model of eosinophilic esophagitis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 53(4):409–16.
- Ryšlavá, H., Doubnerová, V., Kavan, D., and Vaněk, O. (2013). Effect of posttranslational modifications on enzyme function and assembly. *Journal of proteomics*, 92:80–109.
- Sabbioni, S., Barbanti-Brodano, G., Croce, C. M., and Negrini, M. (1997). GOK: a gene at 11p15 involved in rhabdomyosarcoma and rhabdoid tumor development. *Cancer research*, 57(20):4493–7.

- Sadighi Akha, A. a. and Miller, R. a. (2005). Signal transduction in the aging immune system. *Current opinion in immunology*, 17(5):486–91.
- Sato, S., St-Pierre, C., Bhaumik, P., and Nieminen, J. (2009). Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Immunological reviews*, 230(1):172–87.
- Schachter, H. (1991). The 'yellow brick road' to branched complex N-glycans. *Glycobiology*, 1(5):453–61.
- Schachter, H. (2000). The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconjugate journal*, 17(7-9):465–83.
- Schaff, U. Y., Dixit, N., Procyk, E., Yamayoshi, I., Tse, T., and Simon, S. I. (2010). Orail regulates intracellular calcium, arrest, and shape polarization during neutrophil recruitment in shear flow. *Blood*, 115(3):657–66.
- Schattner, M. (2014). Platelets and galectins.
- Schauer, R. (1985). Sialic acids and their role as biological masks. *Trends in Biochemical Sciences*, 10(9):357–360.
- Schauer, R. (2001). Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate Journal*, 17(7-9):485–499.
- Schauer, R. (2009). Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Current opinion in structural biology*, 19(5):507–14.
- Schuhmann, M. K., Stegner, D., Berna-Erro, A., Bittner, S., Braun, A., Kleinschnitz, C., Stoll, G., Wiendl, H., Meuth, S. G., and Nieswandt, B. (2010). Stromal interaction molecules 1 and 2 are key regulators of autoreactive T cell activation in murine autoimmune central nervous system inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(3):1536–42.
- Schultz, M. J., Swindall, A. F., and Bellis, S. L. (2012). Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer metastasis reviews*, 31(3-4):501–18.
- Schwarz, D. S., Hutvágner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell*, 115(2):199–208.
- Scrimgeour, N., Litjens, T., Ma, L., Barritt, G. J., and Rychkov, G. Y. (2009). Properties of Orail mediated store-operated current depend on the expression levels of STIM1 and Orail proteins. *The Journal of physiology*, 587(Pt 12):2903–18.

- Seales, E. C., Jurado, G. A., Brunson, B. A., Wakefield, J. K., Frost, A. R., and Bellis, S. L. (2005). Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer research*, 65(11):4645–52.
- Sharma, S., Quintana, A., Findlay, G. M., Mettlen, M., Baust, B., Jain, M., Nilsson, R., Rao, A., and Hogan, P. G. (2013). An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca²⁺ entry. *Nature*.
- Shaw, P. J. and Feske, S. (2012). Regulation of lymphocyte function by ORAI and STIM proteins in infection and autoimmunity. *The Journal of physiology*, 590(Pt 17):4157–67.
- Shaw, P. J., Qu, B., Hoth, M., and Feske, S. (2012). Molecular regulation of CRAC channels and their role in lymphocyte function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- Sheng, L., Leshchyns'ka, I., and Sytnyk, V. (2013). Cell adhesion and intracellular calcium signaling in neurons. *Cell communication and signaling : CCS*, 11(1):94.
- Sherf, B. a., Navarro, S. L., Hannah, R. R., and Wood, K. V. (1996). Dual-Luciferase Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays. *Promega Notes*, 57(Figure 1):2–8.
- Shibuyas, N., Goldstein, I. J., Broekaertg, W. F., Nsimba-lubakiq, M., Peetersll, B., and Peumansg, W. J. (1987). The Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Bark Lectin Recognizes the Neu5Ac(a2-6)Gal/GalNAc Sequence. *The Journal of biological chemistry*, pages 1596–1601.
- Soboloff, J., Rothberg, B. S., Madesh, M., and Gill, D. L. (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(9):549–65.
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Hewavitharana, T., He, L.-P., Xu, W., Johnstone, L. S., Dziadek, M. A., and Gill, D. L. (2006a). STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ Entry. *Current biology : CB*, 16(14):1465–70.
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Tang, X. D., Hewavitharana, T., Xu, W., and Gill, D. L. (2006b). Orail and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *The Journal of biological chemistry*, 281(30):20661–5.
- Song, D. J., Cho, J. Y., Lee, S. Y., Miller, M., Rosenthal, P., Soroosh, P., Croft, M., Zhang, M., Varki, A., and Broide, D. H. (2009). Anti-Siglec-F antibody reduces allergen-induced eosinophilic inflammation and airway remodeling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(8):5333–41.
- Sonnenburg, J. L., Altheide, T. K., and Varki, A. (2004). A uniquely human consequence of domain-specific functional adaptation in a sialic acid-binding receptor. *Glycobiology*, 14(4):339–46.

- Stanisz, H., Saul, S., Müller, C. S. L., Kappl, R., Niemeyer, B. A., Vogt, T., Hoth, M., Roesch, A., and Bogeski, I. (2014). Inverse regulation of melanoma growth and migration by Orai1/STIM2-dependent calcium entry. *Pigment cell & melanoma research*, 27(3):442–53.
- Stanley, P. (1989). Chinese hamster ovary cell mutants with multiple glycosylation defects for production of glycoproteins with minimal carbohydrate heterogeneity. *Molecular and cellular biology*, 9(2):377–83.
- Stathopulos, P. B. and Ikura, M. (2014). Structural aspects of calcium-release activated calcium channel function. *Channels*, 7(5):344–353.
- Stathopulos, P. B., Li, G.-Y., Plevin, M. J., Ames, J. B., and Ikura, M. (2006). Stored Ca^{2+} depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca^{2+} entry. *The Journal of biological chemistry*, 281(47):35855–62.
- Stewart, M. (2005). "The Hours" Greek Mythology: From the Iliad to the Fall of the Last Tyrant.
- Swindall, A. F. and Bellis, S. L. (2011). Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 286(26):22982–90.
- Takahashi, Y., Murakami, M., Watanabe, H., Hasegawa, H., Ohba, T., Munehisa, Y., Nobori, K., Ono, K., Iijima, T., and Ito, H. (2007). Essential role of the N-terminus of murine Orai1 in store-operated Ca^{2+} entry. *Biochemical and biophysical research communications*, 356(1):45–52.
- Tamir, A., Eisenbraun, M. D., Garcia, G. G., and Miller, R. A. (2000). Age-Dependent Alterations in the Assembly of Signal Transduction Complexes at the Site of T Cell/APC Interaction. *The Journal of Immunology*, 165(3):1243–1251.
- Tarentino, A. L., Gomez, C. M., and Plummer, T. H. (1985). Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry*, 24(17):4665–4671.
- Thoman, M. L. and Weigle, W. O. (1981). Lymphokines and aging: interleukin-2 production and activity in aged animals. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 127(5):2102–6.
- Thompson, J., Mignen, O., and Shuttleworth, T. J. (2010). The N-terminal domain of Orai3 determines selectivity for activation of the store-independent ARC channel by arachidonic acid. *Channels*.
- Thompson, J. L. and Shuttleworth, T. J. (2013). How many Orai's does it take to make a CRAC channel? *Scientific reports*, 3:1961.

- Toscano, M. a., Bianco, G. a., Ilarregui, J. M., Croci, D. O., Correale, J., Hernandez, J. D., Zwirner, N. W., Poirier, F., Riley, E. M., Baum, L. G., and Rabinovich, G. a. (2007). Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nature immunology*, 8(8):825–34.
- Tretter, V., Altmann, F., and Marz, L. (1991). Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha1 3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *European Journal of Biochemistry*, 199(3):647–652.
- Tribulatti, M. V., Cattaneo, V., Hellman, U., Mucci, J., and Campetella, O. (2009). Galectin-8 provides costimulatory and proliferative signals to T lymphocytes. *Journal of leukocyte biology*, 86(2):371–80.
- Tulsianis, D. R. P. and Touster, O. (1983). Swainsonine Causes the Roduction of Hybrid Glycoproteins by Human Skin Fibroblasts and Rat Liver Golgi Preparations.
- van Kooyk, Y. and Rabinovich, G. A. (2008). Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature immunology*, 9(6):593–601.
- Vangheluwe, P., Raeymaekers, L., Dode, L., and Wuytack, F. (2005). Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. *Cell calcium*, 38(3-4):291–302.
- Varki, A. (2001). Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution. *American journal of physical anthropology*, Suppl 33:54–69.
- Varki, A. (2007). Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature*, 446(April):1023–1029.
- Varki, A. (2010). Colloquium paper: uniquely human evolution of sialic acid genetics and biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 Suppl:8939–46.
- Varki, A. and Angata, T. (2006). Siglecs - The major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology*, 16(1):1–27.
- Varki, A. and Gagneux, P. (2012). Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1253:16–36.
- Varki, A., Kannagi, R., and Toole, B. P. (2009). Glycosylation Changes in Cancer. In *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Varki, N. M. and Varki, A. (2007). Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 87(9):851–7.

- Veldhuizen, E. J. A., van Eijk, M., and Haagsman, H. P. (2011). The carbohydrate recognition domain of collectins. *The FEBS journal*, 278(20):3930–41.
- Videira, P. A., Amado, I. F., Crespo, H. J., Algueró, M. C., Dall’Olio, F., Cabral, M. G., and Trindade, H. (2008). Surface alpha 2-3- and alpha 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis. *Glycoconjugate journal*, 25(3):259–68.
- Vig, M., Beck, A., Billingsley, J. M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, D. L., Soboloff, J., Gill, D. L., Fleig, A., Kinet, J.-P., and Penner, R. (2006a). CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Current biology : CB*, 16(20):2073–9.
- Vig, M., DeHaven, W. I., Bird, G. S., Billingsley, J. M., Wang, H., Rao, P. E., Hutchings, A. B., Jouvin, M.-H., Putney, J. W., and Kinet, J.-P. (2008). Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels. *Nature immunology*, 9(1):89–96.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, a., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, a., Penner, R., and Kinet, J.-P. (2006b). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5777):1220–3.
- Vitale, C., Romagnani, C., Falco, M., Ponte, M., Vitale, M., Moretta, A., Bacigalupo, A., Moretta, L., and Mingari, M. C. (1999). Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26):15091–6.
- von Gunten, S. and Bochner, B. S. (2008). Basic and clinical immunology of Siglecs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1143:61–82.
- Walzel, H., Fahmi, A. a., Eldesouky, M. a., Abou-Eladab, E. F., Waitz, G., Brock, J., and Tiedge, M. (2006). Effects of N-glycan processing inhibitors on signaling events and induction of apoptosis in galectin-1-stimulated Jurkat T lymphocytes. *Glycobiology*, 16(12):1262–71.
- Williams, R. T., Manji, S. S., Parker, N. J., Hancock, M. S., Van Stekelenburg, L., Eid, J. P., Senior, P. V., Kazenwadel, J. S., Shandala, T., Saint, R., Smith, P. J., and Dziadek, M. a. (2001). Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *The Biochemical journal*, 357:673–685.
- Williams, R. T., Senior, P. V., Van Stekelenburg, L., Layton, J. E., Smith, P. J., and Dziadek, M. A. (2002). Stromal interaction molecule 1 (STIM1), a transmembrane protein with growth suppressor activity, contains an extracellular SAM domain modified by N-linked glycosylation. *Biochimica et biophysica acta*, 1596(1):131–7.

- Wu, C., Rauch, U., Korpos, E., Song, J., Loser, K., Crocker, P. R., and Sorokin, L. M. (2009). Sialoadhesin-positive macrophages bind regulatory T cells, negatively controlling their expansion and autoimmune disease progression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(10):6508–16.
- Wu, M. M., Buchanan, J., Luik, R. M., and Lewis, R. S. (2006). Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *The Journal of cell biology*, 174(6):803–13.
- Xiao, C. and Rajewsky, K. (2009). MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell*, 136(1):26–36.
- Yang, D. and Miller, R. A. (1999). Cluster formation by protein kinase C θ during murine T cell activation: effect of age. *Cellular immunology*, 195(1):28–36.
- Yang, R.-Y., Rabinovich, G. A., and Liu, F.-T. (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert reviews in molecular medicine*, 10:e17.
- Yang, S., Zhang, J. J., and Huang, X.-Y. (2009). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer cell*, 15(2):124–34.
- Yeromin, A., Zhang, S., Jiang, W., and Yu, Y. (2006a). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*.
- Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., and Cahalan, M. D. (2006b). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*, 443(7108):226–9.
- Yokoi, H., Choi, O. H., Hubbard, W., Lee, H.-S., Canning, B. J., Lee, H. H., Ryu, S.-D., von Gunten, S., Bickel, C. A., Hudson, S. A., Macglashan, D. W., and Bochner, B. S. (2008). Inhibition of Fc ϵ RI-dependent mediator release and calcium flux from human mast cells by sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 8 engagement. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 121(2):499–505.e1.
- Yu, H. and Chen, X. (2007). Carbohydrate post-glycosylational modifications. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 5(6):865–872.
- Yue, L., Peng, J. B., Hediger, M. A., and Clapham, D. E. (2001). CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature*, 410(6829):705–9.
- Zeiger, W., Ito, D., Swetlik, C., Oh-hora, M., Villereal, M. L., and Thinakaran, G. (2011). Stanniocalcin 2 is a negative modulator of store-operated calcium entry. *Molecular and cellular biology*, 31(18):3710–22.
- Zelensky, A. N. and Gready, J. E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *The FEBS journal*, 272(24):6179–217.

- Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Zhang, X. H.-F., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K. A., and Cahalan, M. D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca^{2+} influx identifies genes that regulate Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24):9357–62.
- Zheng, L., Stathopulos, P. B., Schindl, R., Li, G.-Y., Romanin, C., and Ikura, M. (2011). Auto-inhibitory role of the EF-SAM domain of STIM proteins in store-operated calcium entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4):1337–42.
- Zhu, Y., Srivatana, U., Ullah, A., Gagneja, H., Berenson, C. S., and Lance, P. (2001). Suppression of a sialyltransferase by antisense DNA reduces invasiveness of human colon cancer cells in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1536(2-3):148–160.
- Zhuo, Y. and Bellis, S. L. (2011). Emerging role of α 2,6-sialic acid as a negative regulator of galectin binding and function. *The Journal of biological chemistry*, 286(8):5935–41.
- Zweifach, a. and Lewis, R. S. (1993). Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(July):6295–6299.

Abbildungsverzeichnis

1	Regulation der Ca^{2+} -Signalgebung durch Ionenkanäle in Lymphozyten . . .	13
2	Orai1	15
3	Der molekulare Mechanismus der CRAC-Kanal-Aktivierung	18
4	Schematische Darstellung der N- und O-Glykosylierung in Säugetieren . . .	23
5	C-Typ-Lektine	26
6	Die Siglec-Familie	28
7	Relative Bindungsaffinitäten verschiedener Siglecs	29
8	Strukturen von Galektinen und Galektin-Glykan-Interaktionen	32
9	Biogenese von microRNAs	41
10	Schematische Darstellung von pMIR_TK-RNL und den einklonierten Kon- strukten	56
11	Schematische Darstellung von pSG5 und den einklonierten Konstrukten . .	56
12	Schematische Darstellung von pMIR_TK-RNL \emptyset CMV und den einklonierten Konstrukten	57
13	Die Glykosylierung von Orai1	89
14	SOCE nach Deglykosylierung mit Tunicamycin	91
15	Expression von Orai1 und STIM1, Charakterisierung der Glykosylierung und Visualisierung des Tunicamycin-Effektes	93
16	Charakterisierung mit Lektinen I	95
17	Charakterisierung mit Lektinen II	97
18	Expression von ST6Gal1	99
19	SOCE nach Herunterregulation von ST6Gal1 in naiven T-Zellen	101
20	SOCE nach Herunterregulation von ST6Gal1 und ST3Gal in Jurkat-T-Zellen	102
21	Inhibition der Golgi-Mannosidase II mit Swainsonin	104
22	Stabile Expression von HA-Orai1 _{WT/N223A} in Jurkat-T-Zellen I	106
23	Stabile Expression von HA-Orai1 _{WT/N223A} in Jurkat-T-Zellen II	108
24	Die Wirkung von Tunicamycin und α -CD3/ α -CD28- <i>Beads</i> auf SOCE in stabil HA-Orai1 _{WT/N223A} exprimierenden Jurkat-T-Zellen	110
25	Expression von Orai1 _{WT/N223A} in CHO _{WT/Lec} -Zellen	111
26	I _{Orai1} und SOCE in CHO _{WT/Lec} -Zellen transfiziert mit Orai1 _{WT/N223A} . . .	113

27	Einfluss von PHA und α -CD95 (Apo1.1) auf SOCE und I_{CRAC}	115
28	Oberflächenexpression und Oligomerisierung von Orai1	117
29	Einfluss von $NaClO_3$ auf SOCE und I_{CRAC}	119
30	Einfluss von $NaClO_3$ auf die Expression von Orai1 und STIM1	121
31	Einfluss der Herunterregulation von Siglec-6 und -8 auf SOCE	122
32	Interaktionen von Galektinen mit Orai1	124
33	Die Promotorstärken von Orai1 und Orai3 und der Einfluss von miRNAs auf die Expression Orai3-3'UTR-gekoppelter Gene	126
34	Einfluss von miRNAs auf die Expression von Orai3 und Orai3-3'UTR- gekoppelter Gene	129
35	Modell zur Modulation von SOCE durch Orai1-Glykosylierung und Glykan- bindende Proteine	152
36	Modell zur Modulation von SOCE durch Orai1-Glykosylierung und Glykan- bindende Proteine	153

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete primäre Antikörper	43
2	Verwendete sekundäre Antikörper	43
3	Verwendete Bakterienstämme	44
4	Verwendete Chemikalien	44
4	Verwendete Chemikalien	45
5	Verwendete Größenstandards	45
6	Verwendete Filter im Bio-Imager	46
7	Verwendete Komponenten am Imaging-Messplatz	46
8	Verwendete Filter am Imaging-Messplatz	46
9	Verwendete Komponenten am Patch-Clamp Messplatz	46
10	Verwendete Filter im Cell-Observer	47
11	Verwendete Geräte	47
12	Externe-Patch-Lösungen	48
13	Interne-Patch-Lösungen	48
14	Imaging-Lösungen	48
15	Verwendete Lektine	51
16	Verwendete Lektine (Abkürzung) unter Angabe der Konjugation	51
17	Verwendete modifizierende Enzyme	52
18	Verwendete miRNA-mimics	52
19	Verwendete Oligonukleotide (<i>Primer</i>) für qRT-PCR	52
19	Verwendete Oligonukleotide (<i>Primer</i>) für qRT-PCR	53
20	Verwendete Oliognukleotide (<i>Primer</i>) für PCR	53
21	Verwendete siRNA	54
22	siRNA-Sonderanfertigungen	54
23	Verwendete Reagenzien-Systeme	54
23	Verwendete Reagenzien-Systeme	55
24	Verwendete Plasmide	55
25	Für diese Arbeit hergestellte Konstrukte	57
26	Verwendetes Verbrauchsmaterial	58
27	Verwendete Transfektionsreagenzien	58
28	Verwendete Zellkulturmedien	59

29	Verwendete Zellkulturzusätze	59
30	Verwendete Zelllinien	60
31	Pipettierschema der durchgeführten PCR-Reaktionen	62
32	Temperatur-Zyklus-Konditionen für PCR-Reaktionen	62
33	Pipettierschema der durchgeführten Kolonien-PCR-Reaktionen	63
34	Temperatur-Zyklus-Konditionen für Kolonien-PCR-Reaktionen	64
35	Pipettierschema der durchgeführten Restriktionsverdaue	64
36	Pipettierschema für Dephosphorylierungen mit alkalischer Phosphatase . .	65
37	Pipettierschema für Ligationen	67
38	Elektroporationsbedingungen	71
39	Konzentration der siRNA bei Elektroporation	72
40	Konzentration der Plasmide bei Elektroporation	72
41	Transfektionsbedingungen bei Verwendung lipophiler Transfektions Agenzien	73
42	Temperatur-Zyklus-Konditionen für qRT-PCR-Reaktionen	74
43	Pipettierschema Trenngele	75
44	Pipettierschema für Sammelgele	76
45	Rampenprotokolle	80
46	Verwendete Lektine zur Charakterisierung der Glykosylierung von Orai1 . .	94
47	Verwendete Abkürzungen	189
47	Verwendete Abkürzungen	190
47	Verwendete Abkürzungen	191
47	Verwendete Abkürzungen	192

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 47: **Verwendete Abkürzungen**

Abk.	englisch	deutsch
ago	argonaut	
APS	ammonium persulfate	Ammoniumpersulfat
ARC	arachidonate-regulated Ca^{2+} channel	Arachidonsäure-aktivierter Ca^{2+} -Kanal
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid	1,2-Bis(O-Aminophenoxy)Ethane-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
BCA	bicinchonin acid	Bicinchoninsäure
BCR	b cell receptor	B-Zell-Rezeptor
BCS	bovine calf serum	Bovines Kälber-Serum
BSA	bovine serum albumin	Bovines Serum-Albumin
CAD	CRAC activation domain	CRAC-Aktivierungsdomäne
CAM	cell adhesion molecule	Zelladhäsionsmolekül
CBCPs	Calx- β and CTLD containing protein	Calx- β -und-CTLD-enthaltendes Protein
CC	coiled-coil	
CD	cluster of differentiation	Differenzierungscluster
CHO	chinese hamster ovary	aus den Ovarien des chinesischen Hamsters
CIF	calcium influx factor	Kalzium-Einstromfaktor
CMV	cytomegalovirus	Cytomegalovirus
CNXN	calnexin	Calnexin
COSMC	core 1 β 3-Gal-T-specific molecular chaperone	Kern-1- β 3-Gal-T-spezifisches-molekulares Chaperon
CRAC	calcium release activated calcium	Ca^{2+} -Einstrom aktiviert durch Ca^{2+} -Freisetzung
CRD	carbohydrate recognition domain	Zucker-Erkennungsdomäne

Tabelle 47: **Verwendete Abkürzungen**

Abk.	englisch	deutsch
CREB	cAMP-responsive-element binding protein	cAMP-empfindliches-Element-bindendes Protein
CTLD	C type lectin like domain	C-Typ-Lektin-ähnliche Domäne
DAP12	DNAX activation protein of 12 kDa	DNAX-Aktivierungs-Protein mit 12 kDa
DC	dendritic cell	Dendritische Zelle
DGCR	DiGeorge syndrome critical region	DiGeorge-Syndrom-kritische-Region
DMSO	dimethyl sulfoxide	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
DTT	dithiothreitol	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemi luminescence	Verstärkte Chemilumineszenz
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-Ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid	Ethylenglykoltetraessigsäure
EMBP	eosinophil major basic protein	Eosinophiles Haupt-Basisches Protein
ER	endoplasmic reticulum	Endoplasmatisches Retikulum
FCεR	high-affinity receptor for the Fc region of immunoglobulin E	Hochaffiner Rezeptor für die Fc-Region von Immunglobulin E
FCS	fetal calf serum	Fetales Kälber-Serum
FRET	Förster resonance energy transfer	Förster-Resonanzenergietransfer
GAG	glycosaminoglycans	Glykosaminoglykane
GBP	glyco-binding-protein	glykobindendes Protein
GlcI	glucan endo-1,3-β-D-glucosidase	Glukan-Endo-1,3-β-D-Glukosidase
GnT-V	N-acetylglucosaminyltransferase	N-Acetylglukosaminyltransferase
GRB2	growth factor receptor bound protein 2	Wachstumsfaktorrezeptor-gebundenes Protein 2
HA	human influenza hemagglutinin	Humanes Influenza Hemagglutinin
HDL	high-density lipoprotein	hochdichtes Lipoprotein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
IFN- γ	interferon γ	Interferon γ
IL17A	interleukin 17A	Interleukin 17A
InsP3	inositol-1,4,5-trisphosphate	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes aktivierendes Motif

Tabelle 47: **Verwendete Abkürzungen**

Abk.	englisch	deutsch
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes inhibitorisches Motif
ITSM	immunoreceptor tyrosine-based switch motif	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Wechsel-Motif
Lak	lactose	Laktose
LAT	linker for activation of T cells	Linker für die Aktivierung von T-Zellen
LDL	low-density lipoprotein	Niedrigdichtes Lipoprotein
LV	empty vector	Leervektor
MAH	maackia amurensis hemagglutinin	Hemagglutinin aus Asiatischem Gelbholz
MAL	maackia amurensis leuagglutinin	Leuagglutinin aus Asiatischem Gelbholz
MEF2	myocyte enhancer factor-2	Myocyten-Verstärkungsfaktor 2
Mgat5	mannosyl (α -1,6-)-glycoprotein β -1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase	Mannosyl (α -1,6-)-Glykoprotein- β -1,6-N-Acetyl-Glukosaminyltransferase
miRNA	microRNA	MicroRNA
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Exchanger	Natrium-Kalzium-Austauscher
NFAT	nuclear factor of activated T cells	nucleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NF- κ B	nuclear factor- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NK	natural killer	Natürliche Killer
O _{Gly} BP		Orai1-glykosyliert-bindendes-Protein
OGT	O-linked N-acetylglucosamine transferase	O-verknüpfende N-Acetylglucosamin-Transferase
OST	oligosaccharyltransferase	Oligosaccharyltransferase
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	Periphere Mononukleäre-Blutzellen
PBS	phosphate-buffered saline	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction	Polymerasekettenreaktion
PHA	phytohemagglutinin	Phytohämagglutinin
PLC γ	phospholipase C γ	Phospholipase C γ
(PNG) _{ase}	peptide-N-glycosidase F	Peptide-N-Glykosidase F
pre-miR	precursor-miRNA	Vorläufer-miRNA
PVA	poly(vinyl alcohol)	Poly(vinylalkohol)
PVDF	polyvinylidene fluoride	Polyvinylidenfluorid
REG	regenerating gene	Erholungs-Gen
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer	Radioimmunopräzipitations-Assay-Puffer

Tabelle 47: **Verwendete Abkürzungen**

Abk.	englisch	deutsch
RISC	RNA induced silencing complex	RNA-induzierter Silencing-Komplex
RT	room temperature	Raumtemperatur
SAM	sterile alpha motif	steriles Alpha-Motiv
SCID	severe combined immunodeficiency	Schwere kombinierte Immunschwäche
SDS	sodium dodecyl sulfate	Natriumlaurylsulfat
SEEC	soluble protein containing SCP, EGF, EGF and CTLD domains	lösliches Protein das SCP-, EGF, EGF- und CTLD-Domänen enthält
SERCA	sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum calcium ATPase	Sarkoplasmatische/ endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase
Sig	siglec	Siglec
Siglec	sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins	Sialylsäure-bindende Immunglobulin-ähnlichen Lektine
SNA	sambucus nigra agglutinin	Holunder-Agglutinin
SOCE	store operated calcium entry	speichergesteuerter Kalzium-Einstrom
SR	sarcoplasmic reticulum	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSC	saline sodium citrate	Salzlösung-Natrium-Citrat
ST6Gal1	β -galactosamide α -2,6-sialyltransferase 1	β -Galaktosamid- α -2,6-Sialyltransferase 1
STIM	stromal interaction molecule	stromaständiges Interaktionsmolekül
Swai	swainsonine	Swainsonin
T	transferase	Transferase
TCR	t cell receptor	T-Zell-Rezeptor
TEA-HLC	triethylamine hydrochloride	Triethylaminhydrochlorid
TEMED	tetramethylethylenediamine	Tetramethylethylenediamin
TH	t helper	T-Helfer
TM	transmembrane domain	Transmembrandomäne
TNFR	tumor necrosis factor receptor	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TRP	transient receptor potential cation channel	Transientes-Rezeptor-Potential-Kationen-Kanal
Tun	tunicamycine	Tunicamycin
UdS		Universität des Saarlandes
UPR	unfolded protein response	Ungefaltetes-Protein-Antwort
UTR	untranslated region	Untranslatierte Region
WGA	wheat germ agglutinin	Weizenkeim-Agglutinin
ZAP70	ζ -chain associated protein kinase of 70 kDa	ζ -Ketten assoziierte Protein-Kinase mit 70 kDa

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

- Die Klonierung der jeweiligen in Abschnitt 2.11.2 angegebenen Konstrukte erfolgte durch Dr. Alansary und Dr. Tatiana Kilch und Dr. Martin Hart
- Die Etablierung der stabilen pCasper3-GR Jurkat T-Zelllinie (siehe Tab. 30) erfolgte durch Christian Backes
- Die Durchführung der Northernblots in Abbildung 33C erfolgte unter der Aufsicht von Dr. Martin Hart
- Die Durchführung und Auswertung der Apoptose-Assays in Abbildung 27D-E erfolgte unter der Aufsicht von Carsten Kummerow und Christian Backes
- Durchführung und Auswertung der Patch-Messungen dargestellt in Abbildung 27C 29F-G und erfolgten durch Jun. Prof. Christine Peinelt und Sven Kappel
- Durchführung und Auswertung der Patch-Messungen dargestellt in Abbildung 26A-B sowie 32C erfolgten durch Dr. Tatiana Kilch
- Durchführung und Auswertung der genannten Imaging Experimente in Abbildung 22B und 23C erfolgten durch Ewa Slowig im Rahmen ihres von mir betreuten F-Praktikums
- Alle qRT-PCRs wurden nach meiner Anweisung von Gertrud Schwär durchgeführt
- Die Isolierung von naiven Lymphozyten erfolgte durch Carmen Hässig
- Die regelmäßig Passage aller beschriebenen Zelllinien wurde von Gertrud Schwär, Cora Hoxha und Sandra Janku übernommen

- Alle verwendeten Imaging-Lösungen wurde von Petra Fries vorbereitet

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift des Promovierenden

.....
Unterschrift der die Versicherung an Eides statt
aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden
Beamten

Danksagung

In diesem Moment, indem der schriftliche Abschluss meiner Dissertation in greifbare Nähe rückt, möchte diese letzten Seiten gerne nutzen, um mich bei all jenen zu bedanken, die mich auf diesem langen Weg begleitet haben und deren Hilfe und Unterstützung mir für die Erstellung dieser Arbeit unverzichtbar war:

Mein allererster Dank geht an Jun. Prof. Christine Peinelt, Prof. Barbara Niemeyer und Prof Markus Hoth. Danke! - für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die jahrelange Förderung, für die immerwährende Unterstützung in technischen und theoretischen Fragen, die zahllosen Anregungen und Vorschläge und nicht zuletzt eure unbezahlbare moralische Unterstützung in Krisensituationen. Bessere Chefs hätt' ich nicht haben können! :)

Ein besonderer Dank geht auch an Dr. Dalia Al-Ansary, die mit ihrer unendlichen Expertise in allen Fragen des Laboralltags und nicht zuletzt einem gehörigen Ausmaß an Geduld einen unschätzbaren Anteil zu meiner Ausbildung beigetragen hat.

Ein großes Dankeschön geht auch an Gertrud Schwär, Carmen Hässig, Sandra Janku und Petra Fries für die hervorragende technische Unterstützung, die mir so vieles erleichtert hat.

Für moralischen und musikalischen Beistand in allen Lagen des Lebens, rund um Gartenbau und Rechtschreibung, über Stromschnellen hinweg sowie in Eis und Schnee geht mein Dank an meine Bürokollegen Kim Friedmann, Cora Hoxha und Dr. Annette Lis: wohin ich auch gehe: Ihr und unser lauschiges Zimmerchen in Gebäude 58 werdet mir für immer fehlen!

Danke auch an alle anderen Mitstreiter und langjährigen Begleiter in der Biophysik der UdS: an Anna meine Lieblings-Bachelorette, an Arne, Maik und Adrian für all die schönen Westernblots, die ich mit euch machen durfte, an Ivan, Carsten und ChrisB für eure unverzichtbare Hilfe mit zickigen Mikroskopen, die mir so manches Experiment gerettet hat und Sven und Tatiana für ihre wunderschönen Patch-Traces ;)

Und nicht zuletzt DANKE an meine lieben Korrekturleser Henrike, Andy und Verena und Ronja dass ihr mich so tapfer in meinem Kampf gegen die Rechtschreibung unterstützt habt :-D

Dafür, dass sie es von Allen am längsten mit mir ausgehalten haben, möchte ich mich besonders bei meiner Schwester Stephanie und meinen Eltern Gisela und Hans-Günter sowie meiner Oma Cilli bedanken. Ihr habt mich immer unterstützt und gefördert wo ihr

nur konntet. Ich hoffe ihr wisst, wie viel mir das bedeutet.

Ich möchte diese Arbeit außerdem gerne Berthold Schu widmen, dessen unbedingte Wertschätzung mich zu dem gemacht hat, was ich bin. Ich weiss, wie stolz du gewesen wärst. Für Dich, Opa!